

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A gerjesztő fényintenzitás és az antitest jelölési arányának
hatása a kvantitatív fluoreszcenciás mérésekre**

Szendi-Szatmári Tímea

Témavezető: Prof. Dr. Nagy Péter



Debreceni Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2020

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Rövidítések jegyzéke.....	5
1. Bevezetés.....	6
1.1. FRET	7
1.2. FRET mérési módszerek	10
1.2.1. Fluoreszcencia intenzitás alapú mérések.....	10
1.2.1.1. Donor kioltás (quenching)	10
1.2.1.2. Akceptor fotoelhalványítás	11
1.2.1.3. Szenzitizált akceptor fluoreszcencia	11
1.2.1.4. Donor fotoelhalványítás.....	15
1.2.2. Fluoreszcencia élettartam mérések.....	16
1.2.3. Fluoreszcencia anizotrópiamérések.....	17
1.3. Antitestek jelölési módszerei, a jelölés hatása az antitestekre	18
1.4. Az antitest jelölés hatása a fluorofórokra	21
1.5. További fluoreszcens jelölési módszerek.....	22
1.5.1. Fluoreszcens proteinek.....	22
1.5.2. Fehérjéhez kapcsolt rövid szekvencia jelölése kémiai specificitás alapján	24
1.5.3. Fehérjéhez kapcsolt szekvenciák enzimatis jelölése	25
1.5.4. Önjelölésre képes protein domének	26
1.5.5. Klikk kémia (click chemistry).....	28
2. Problémafelvetés	30
3. Célkitűzés.....	31
4. Elmélet	32
4.1. Fluorofór konjugációs és antitest affinitással kapcsolatos vizsgálatok.....	32
4.1.1. Antitestek jelölési arányának meghatározása spektrofotométerrel	32

4.1.2.	Különböző jelölési arányú antitestek eloszlása a sejthez kötött frakcióban.....	33
4.1.3.	Az antitest oldatok anizotrópiájának függése az egyes antitest specieszek arányától a szabad és a kötött frakció esetében.....	35
4.2.	Fluorofór szaturációs vizsgálatok.....	36
4.2.1.	A donor szaturáció hatása a látszólagos FRET hatékonyságra	36
4.2.2.	A triplet állapot hatása a donor szaturációtól függő látszólagos FRET hatékonyságra.....	39
4.2.3.	A fluorofór szaturáció és a látszólagos foton-fluxus meghatározása	42
4.2.4.	Átvilágítási faktorok és az α paraméter a szaturáció tekintetében	44
4.2.5.	Donor szaturációt figyelembe vevő FRET hatékonyság meghatározása intenzitás alapú kísérletek során.....	47
4.2.6.	Donor szaturációt és FRET frusztrációt számításba vevő FRET hatékonyság meghatározás intenzitás alapú kísérletek során.....	48
5.	Anyagok és módszerek.....	51
5.1.	Sejtvonalak.....	51
5.2.	Antitestek	51
5.3.	Sejtek fluoreszcens jelölése fedőlemezen és szuszpenzióban.....	52
5.4.	Sejtek tranziens transzfekciója és az alkalmazott plazmidok.....	54
5.5.	Konfokális mikroszkópia	54
5.6.	A mobilis fluorofórok szaturációjának mérése	55
5.7.	Lézerintenzitás mérések	56
5.8.	Fluoreszcenciás képek elemzése	56
5.9.	Áramlási citometria	57
5.10.	Fluorimetria, fluoreszcencia anizotrópia mérése.	57
5.11.	Sejthez kötött antitestek izolálása immunprecipitációval	58
5.12.	Fluoreszcencia élettartam mérések.....	58
5.13.	Egyedi molekula fluoreszcenciás mérések.....	59
6.	Eredmények.....	61

6.1. Az antitest jelölés hatása az antitestek affinitására és a festékek fotofizikai tulajdonságaira	61
6.1.1. Jelölés hatása az antitestek affinitására	61
6.1.2. A szabad és kötött antitest fluoreszcencia intenzitása eltérően függ a jelölési aránytól.....	62
6.1.3. A szabad és kötött antitestek fluoreszcencia intenzitásainak szimulálása	67
6.1.4. A kötött antitest frakció jelölési arányának meghatározása fluoreszcencia anizotrópia mérésekkel.....	71
6.1.5. Az antitest jelölés hatása a fluoreszcencia élettartamra és a fluorofórok spektrumára	74
6.1.6. Egyedi antitestek fluoreszcencia intenzitás eloszlása a törzsoldatban és a sejthez kötött frakcióban	78
6.2. A fluorofór szaturáció hátrányos hatásainak csökkentése FRET mikroszkópia során	82
7. Eredmények megbeszélése.....	93
7.1. Az antitest jelölés hatása az antitestek és a fluorofórok tulajdonságaira	93
7.2. Fluorofór szaturációs vizsgálatok.....	95
8. Összefoglalás.....	97
9. Summary	98
10. Köszönetnyilvánítás	99
11. Irodalomjegyzék.....	100
12. Tárgyszavak	107
13. Keywords	108
14. Melléklet.....	109
15. Függelék.....	120

Rövidítések jegyzéke

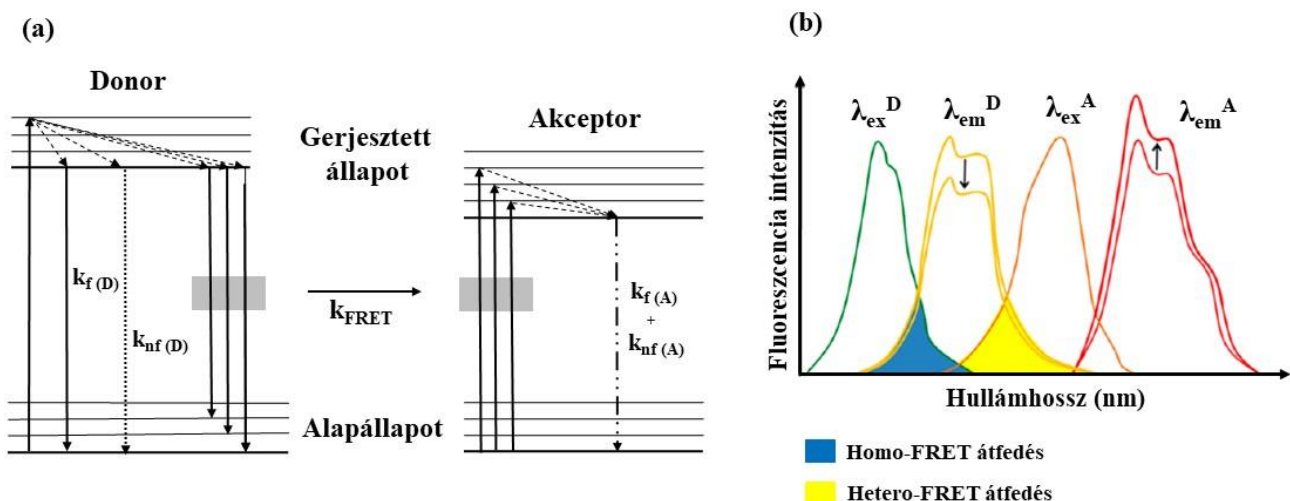
ACP	acil hordozó fehérje
AGT	O6-alkilguanin-DNS-alkiltranszferáz
BSA	marha szérum albumin
DOL	degree of labeling – átlagos festékszám egy antitesten egy adott antitest törzsoldatban
EDTA	etilén-diamin tetraacetát
EGFP	fokozott kifejeződésű zöld fluoreszcens fehérje
F/P	fluorofór/fehérje arány – átlagos festékszám egy antitesten egy adott antitest törzsoldatban
FLAsH	fluorescein arsenical hairpin binder – két arzénatommal módosított fluorescein jelölő molekula
FP	fluoreszcens fehérje
FRET	Förster típusú rezonancia energiatranszfer
GFP	zöld fluoreszcens fehérje
OCT	ciklooktin
PBS	foszfát puffer oldat
PPTáz	foszofopantetein transzferáz
ReAsH	resorufin arsenical hairpin binder - két arzénatommal módosított resorufin jelölő molekula
RFP	vörös fluoreszcens fehérje
SFP szintáz	4'-foszofopantetein transzferáz
SPAAC	[3+2] azid-alkin cikloaddició

1. Bevezetés

Az elmúlt pár évtizedben, a biológiai tudományokban a fluoreszcencia alkalmazása jelentősen megnövekedett. A fluoreszcencia jelensége a lumineszcens folyamatok nagyobb családjához tartozik. A lumineszcencia bármilyen anyag gerjesztett elektronállapotából származó fény emisszióját jelenti. A fluoreszcencia emisszió sebessége jellemzően 10^8 s^{-1} , és a fluoreszcencia élettartama 1-10 ns. A fluoreszcencia élettartam az az átlagos idő, amit a fluorofór gerjesztett állapotban tölt mielőtt újra alapállapotba kerülne [1]. A fluoreszcencia másik jellemző paramétere a fluoreszcencia kvantumhatásfok, ami meghatározza, hogy mennyire fényes egy fluorofór, és a kibocsátott fotonok és az elnyelt fotonok számának hányadosával számolható ki [2]. A fluoreszcenciás technikákat széles körben alkalmazzák különböző biokémiai és biológiai folyamatok molekuláris paramétereinek a meghatározására az érzékenysége, specifikussága illetve az időbeli felbontása miatt [3]. A vizsgált biológiai molekulák fluoreszcenciás jelölésére sokféle eljárás létezik (l. részletesebben az 1.5. fejezetben), de még mindig széleskörűen alkalmaznak ilyen célból fluoreszcensen jelzett antitesteket. A fluoreszcencia paramétereit a fluorofór környezete befolyásolja. Ennek egyik megnyilvánulása a Förster típusú rezonancia energiatranszfer (FRET), ami egyedülálló abban, hogy molekulák konformációváltozásaira, asszociációira és távolságukra érzékeny fluoreszcencia jeleket generáljon. Így képes molekuláris interakciókat és konformációkat feloldani olyan térbeli felbontással, amely messze meghaladja a szokásos optikai mikroszkópia diffrakciós határát ($\sim \lambda / 2$), és kompatibilis a szuperfelbontású technikákkal [4]. Az első, FRET jelenlétére utaló kísérletek a XX. század elején történtek, de Theodor Förster csak 1940-es évek végén dolgozott ki egy olyan átfogó elméletet, amely megfelelően leírja ezt a jelenséget [5]. A Förster típusú rezonancia energiatranszfer alkalmazása az élettudományokban drasztikusan megnőtt az elmúlt 20 évben. Népszerűségéhez az vezetett, hogy a nanométeres skálán lejátszódó folyamatokba betekintést nyújtó legegyszerűbb és legkönnyebben elérhető eljárás, ami információt nyújt a molekulán belüli, és molekulák közötti távolságokról. Miközben egyre több kutató ismeri meg a FRET módszerét és annak előnyeit, még mindig gyakran tekintik túl speciális technikának [6]. Munkám során arra kerestem választ, hogy a fluoreszcens mérések jel/zaj arányának növelésére gyakran alkalmazott két technika, az antitestek jelölési arányának növelése és az erős gerjesztő intenzitás milyen hatást gyakorol a mérések kvantitatív megbízhatóságára.

1.1. FRET

A FRET-et gyakran alkalmazzák molekuláris távolságok meghatározására, illetve hogy kiderítsék bizonyos molekuláris komplexek jelenlétét vagy hiányát [7]. A FRET egy olyan távolság függő folyamat, amelynek során az energia nem radiatív módon, hanem dipól-dipól kölcsönhatás segítségével átadódik egy donorként szolgáló gerjesztett állapotban lévő fluorofórról egy megfelelő akceptor molekulára, ami az esetek többségében szintén fluoreszcens [4]. Ennek köszönhetően a donor molekula legerjesztődik és a megfelelő akceptor molekula egy elektronja magasabb energiaszintre kerül [8]. A donor alacsonyabb hullámhosszon nyeli el az energiát, míg az akceptor abszorpciója hosszabb hullámhosszon történik. A FRET atomi távolságokon belül jön létre rezonancia alapú kölcsönhatás révén, miközben nem jön létre foton transzmisszió a donor és akceptor molekulák között. Mivel FRET csak egymáshoz közeli, 1-10 nm-es távolságon belül lévő molekulák között játszódik le, szokták spektroszkópiai vonalzónak is nevezni. Ha a távolság 1 nm alatti, akkor a donor és az akceptor ütközése, ill. a kettejük közötti elektrontranszfer lenne a domináns, míg 10 nm-nél nagyobb távolság esetében a donor fényemissziója dominálna [9]. A hagyományos heterotranszfer FRET vagy hetero-FRET akkor fordul elő, amikor egy gerjesztett donor kromofór emissziós spektruma átfedésben van egy tőle kémiai és spektroszkópiailag is megkülönböztethető akceptor kromofór abszorpciós spektrumával. A jelenségnek számos fotofizikai megnyilvánulása van, amelyek mindegyike megfelelő kísérleti technikát eredményez a FRET hatékonyságának kimutatására: (i) szenzitizált emisszió az akceptor fluorofórról; (ii) a donor fluoreszcencia emissziójának kioltása; (iii) a donor fluoreszcencia élettartama csökken, aminek mechanizmusa hasonló a donorkioltáshoz; (iv) lassúbb donor fotoelhalványítás és (v) a donor fluoreszcencia polarizációjának változása. Gyakran úgy vélik, hogy FRET csak két spektroszkópiailag eltérő fluorofór között valósulhat meg. FRET azonban spektroszkópiailag azonos molekulák között is lejátszódhat azzal a feltétellel, hogy ha kismértékű Stokes-eltolódással (kis eltolódás az excitációs és emissziós csúcsok között) rendelkeznek. Az energiaátadást azonos fluorofórok esetében homo-FRET-nek nevezzük. Mivel ebben az esetben a donor és az akceptor spektroszkópiailag megkülönböztethetetlen, az intenzitás hányados és az élettartam mérések alkalmatlanok a homo-FRET meghatározására. Míg az anizotrópia mérése a hetero-FRET kimutatásának csak az egyik módszere, addig a homo-FRET kimutatására az egyetlen alkalmazható módszer [10], [11]. A Jablonski diagram a FRET lefolyásának legegyszerűbb magyarázatát adja a donor / akceptor gerjesztése és emissziója szempontjából.



1. ábra: Jablonski diagram a FRET jelenségének értelmezésére. (a) Az ábrán a Jablonski diagram látható, ami a Förster típusú rezonancia energiatranszfert (FRET) mutatja be. Az energia elnyelésekor az elektronok mind a donorban, mind az akceptorban alapállapotból gerjesztett állapotba kerülnek, majd vagy fluoreszcencia vagy nem fluoreszcens átmenetek formájában elveszítik az energiájukat a következő sebességi állandókkal: donor esetében $k_{f(D)}$, akceptor esetében $k_{f(A)}$ és nem fluoreszcens mechanizmusokon keresztül $k_{nf(D)}$ a donorra illetve, $k_{nf(A)}$ az akceptorra vonatkozóan. FRET előfordulásakor a donor gerjesztett energiája átadódhat egy akceptorra egy k_{FRET} sebességi állandóval. A (b) ábra a FRET lejátszódásához szükséges spektrális átfedéseket mutatja. A λ_{ex}^D és λ_{em}^D vagy λ_{ex}^A és λ_{em}^A szimbólumok jelölik a donor és akceptor fluorofórok gerjesztési (λ_{ex}), illetve emissziós (λ_{em}) spektrumait. Alapvető fontosságú a spektrumok átfedése mind hetero-FRET (sárga), mind homo-FRET esetében (kék) [9].

A FRET hatékonyság jellemzésére az energiatranszfer hatásfokot (E) használjuk, ami megmutatja a FRET által relaxálódott donorok arányát az összes gerjesztett donor molekulához képest. Az energiatranszfer mértéke nagyban függ a donor és akceptor közötti távolság (R) negatív hatodik hatványától, amit a következő egyenlet ír le:

$$E = \frac{R_0^6}{R^6 + R_0^6} \quad (1)$$

ahol az R az aktuális donor-akceptor távolság, míg R_0 az a távolság, ahol az $E=0,5$. Ha a donor-akceptor távolság R_0 -lal egyenlő, akkor 50% az esélye annak, hogy a gerjesztett donor energiája átadódik egy akceptorra. Ez a távolság általában 3-8 nm között van. Ahogy a

távolság nő a donor illetve az akceptor között, az E értéke csökken [12], [13]. Förster elmélete szerint a FRET sebességi állandója (k_{FRET}) és hatásfoka (E) az alábbi képletekkel írható le:

$$k_{FRET} = const J n^{-4} R^{-6} \kappa^2 \quad (2)$$

$$E = \frac{k_{FRET}}{k_{FRET} + k_{f(D)} + k_{nf(D)}} \quad (3)$$

ahol a $k_{f(D)}$ a donor fluoreszcencia emisszió sebességi állandója és a $k_{nf(D)}$ a donor egyéb, nem fluoreszcens sebességi állandóinak összege. Az R a donor és akceptor molekulák közötti távolság, és a κ^2 az orientációs faktor, amit a donor emissziós dipólusa és az akceptor abszorpciós dipólusa által bezárt szög határoz meg. További paraméter még az n , ami a közeg törésmutatóját adja meg, és a J átfedési integrál, amit a donor emissziós spektruma és az akceptor abszorpciós spektruma határoz meg [14]. A FRET lejátszódásához az alábbi feltételeknek kell teljesülniük: 1.) a donor magas kvantumhatásfokkal rendelkezzen, 2.) a donor emissziós spektruma fedjen át az akceptor abszorpciós spektrumával (minél nagyobb az átfedés, annál nagyobb a FRET mértéke), 3.) a donor elektromos mezője és az akceptor abszorpciós dipólus vektora közel párhuzamosan helyezkedjen el. Ezt az orientációs faktorról jellemezzük, melynek értéke 0-4 között változik. A FRET hatékonyság akkor a legnagyobb, amikor a két vektor párhuzamos egymással ($\kappa^2 = 4$). A transzfer mértéke csökken, ha a két vektor közötti szög növekszik. Ha a két vektor közötti szög 90° , a FRET akkor sem fog lejátszódni, ha a többi feltétel egyébként teljesedik. 4.) A donor és akceptor közötti távolságnak 1-10 nm között kell lennie [12], [15]. Annak függvényében, hogy az alkalmazott donor, illetve akceptor fluorofórok két különböző, vagy egyazon molekulán helyezkednek el, megkülönböztünk intermolekuláris és intramolekuláris FRET méréseket. Az intermolekuláris FRET mérések során a transzfert két különböző molekula/fehérje között vizsgáljuk. Intramolekuláris FRET esetében a donor és az akceptor ugyanahhoz a molekulához konjugáltan található, így ezzel a módszerrel konformációs változások figyelhetők meg [16]. A FRET számtalan mérőműszerrel vizsgálható, melyek közül biológiai szempontból kiemelendő a mikroszkópos képalkotás és az áramlási citometria. Míg az áramlási citometriás FRET (FCET) mérések előnye az, hogy rövid idő alatt nagy sejtpopulációt tudunk megvizsgálni, addig a mikroszkópos megközelítés lehetőséget ad, hogy sejten belüli részleteket megfigyeljünk, illetve pixelenkénti elemzéssel FRET értékeket hasonlíthassunk össze más fluoreszcensen jelölt biológiai információval [17].

1.2. FRET mérési módszerek

A fluoreszcenciának számos spektroszkópai megjelenése van, amik jó érzékenységgel detektálhatóak és szerencsére, FRET hatására ezek a spektroszkópai tulajdonságok megváltoznak. Ezért számos módszer alkalmazható FRET mérésre. A leginkább figyelemre méltó FRET-mérések a következő három megközelítésen alapulnak: 1.) fluoreszcencia intenzitás alapú megközelítés; 2.) fluoreszcencia élettartam alapú megközelítés, 3.) fluoreszcencia anizotropia alapú megközelítés [9].

1.2.1. Fluoreszcencia intenzitás alapú mérések

1.2.1.1. Donor kioltás (quenching)

A donor kioltásának mérése a lehető legegyszerűbb módszere a FRET kísérletes meghatározásának. A FRET azért okozza a donor kioltását, mert egy új legerjesztési lehetőséget biztosít a gerjesztett donorok számára, amely kompetál a többi relaxációs folyamattal. Az ilyen fajta mérések során két különböző minta, egy egyszeresen, donorral jelölt, és egy kétszeresen, donorral és akceptorral egyaránt jelölt minta átlagos donor fluoreszcencia intenzitását hasonlítjuk össze. Feltételezzük, hogy a csak donorral jelölt, illetve a duplán jelölt minták intenzitáskülönbségét az akceptor jelenléte, pontosabban a FRET okozza. Ez egyben a módszer hibája is, hiszen az egyéb intenzitásbefolyásoló tényezőket figyelmen kívül hagyja. Emiatt a módszert sejtpopulációk intenzitásmérésére alkalmazzuk, sejtről-sejtre való FRET meghatározására nem alkalmas. A donor kioltásán alapuló méréseket csak antitesttel jelölt sejteken lehet végezni [12]. A FRET hatékonyság a következő egyenlettel számítható ki:

$$E = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} \quad (4)$$

ahol I_D a donorral jelölt, I_{DA} a donor és akceptorral jelölt minta háttérrel korrigált donor fluoreszcencia intenzitása.

1.2.1.2. Akceptor fotoelhalványítás

Az akceptor fotoelhalványítás egy könnyen alkalmazható FRET mérési módszer, ami tulajdonképpen a donor kioltás mérésének egyik alternatív módszerét jelenti. A donor intenzitását megmérjük az akceptor jelenlétében (I_{DA} 4. egyenletben), majd ugyanazon mintán az akceptor fotoelhalványítása után is (I_D a 4. egyenletben). Az akceptor fotodestrukciója esetén a donor kioltása nem következik be, ennek következtében a donor intenzitása nő, ami arányos a FRET hatékonysággal [17]. Mivel az I_D és I_{DA} értékét ugyanazon mintán határozzuk meg, az eljárás kiküszöböli az intenzitások sejtenkénti variabilitásából származó problémát, és így nemcsak átlagos, hanem sejtenkénti vagy pixelenkénti FRET hatásfok számítására is alkalmas. A fototoxicitás és a hosszú bleaching idő miatt az élő sejteken való alkalmazhatósága korlátozott. Biztosítani kell azt is, hogy a fotoelhalványítás ne befolyásolja a donor fluoreszcens tulajdonságait, és hogy az akceptor a fotoelhalványítás után teljesen el legyen halványítva [18].

1.2.1.3. Szenzitizált akceptor fluoreszcencia

Az akceptor szenzitizált emisszió meghatározásán alapuló FRET módszer a legmegbízhatóbb az intenzitáson alapuló módszerek között. Az akceptor szenzitizált emissziója az akceptor emissziójának azon része, amelyben az akceptor gerjesztése a donortól induló FRET segítségével jön létre [18]. A FRET meghatározása sokkal pontosabban és könnyebben elvégezhető abban az esetben, amikor a donor és akceptor emissziója jól elkülöníthető. Ebben az esetben az ún. FRET csatornában, ahol a donort gerjesztjük, de az akceptor fluoreszcenciáját mérjük, elsősorban az akceptor szenzitizált emissziója érzékelhető. Sajnos ez az optimális helyzet szinte sosem áll elő ilyen tökéletes formában, emiatt szükséges bevezetni az átvilágítási faktorok használatát pl.: a donor és akceptor kölcsönös gerjesztése a másik festék gerjesztési hullámhosszán, valamint a donor és az akceptor fluoreszcencia emissziójának átnyúlása a másik festéknek megfelelő csatornába. A szenzitizált emisszió mérési módszerek három csoportba sorolhatóak a különböző FRET elemzési lehetőségeik alapján: 1.) kétsatornás emisszió vagy excitáció aránymérések; 2.) háromcsatornás emissziós mérések; 3.) spektrális FRET mérések [9].

1.2.1.3.1. Kétsatornás aránymérések

Kétsatornás FRET méréseket mikroszkópon és citométeren is alkalmaznak fehérje-fehérje interakciók vizsgálatára [19], [20]. A donor emisszióját az első csatornában rögzítik, majd az akceptor FRET általi emisszióját a második csatornában. FRET-nek köszönhetően a donor emisszió csökken és az akceptor emisszió nő. A FRET-tel arányos paramétert az adott csatornában kapott emisszió arányaként kapjuk meg. Mivel ez a módszer figyelmen kívül hagyja a donor átvilágítását, illetve az akceptor esetleges direkt gerjesztését, a kapott hányados nem a FRET hatásfokot adja meg, csak egy azzal arányos értéket:

$$E_{ratio} = \frac{I_F}{I_D} \quad (5)$$

ahol az I_F a FRET csatornában mért fluoreszcencia intenzitás, az I_D a donor csatornában mért intenzitás. Mivel az arány kiszámítása egy olyan értéket ad, amely nincs normalizálva a donor és az akceptor expressziós szintjére, a kapott FRET paraméter értéke erősen függ a donor és az akceptor arányától, ezért kizárólag intramolekuláris FRET, FRET-szenzorok vizsgálatára alkalmas, ahol a donor és az akceptor aránya állandó és ismert [21].

1.2.1.3.2. Háromcsatornás emissziós mérések

A háromcsatornás FRET mérések a leggyakrabban alkalmazott FRET technikák közé tartoznak, ami a gerjesztési hullámhosszak és emissziós filterek három különböző kombinációjából adódó mérésen alapszik [22]. Ezen típusú mérések során a donorról vagy akceptorral egyszeresen jelölt, illetve a duplán jelölt minták fluoreszcencia intenzitását három csatornában rögzítjük: 1.) a donor csatorna (I_1): a donort abszorpciós és emissziós hullámhossz tartományában gerjesztjük és detektáljuk; 2.) a FRET csatorna (I_2) esetében a mintát a donor abszorpciós hullámhosszán gerjesztjük, és a fluoreszcenciát az akceptor emissziós hullámhosszán detektáljuk, mely az akceptor szenzitizált emisszióját jellemzi; 3.) az akceptor csatorna (I_3), ahol az abszorpciós és emissziós hullámhosszak megfelelnek az adott akceptor spektrális tulajdonságainak, mely az akceptor direkt emisszióját jellemzi. A különböző csatornák intenzitásait az alábbi egyenletek írják le.

$$\begin{aligned}
I_1 &= I_D (1 - E) + I_A S_4 + I_D E \alpha \frac{S_4}{S_2} \\
I_2 &= I_D (1 - E) S_1 + I_A S_2 + I_D E \alpha \\
I_3 &= I_D (1 - E) S_3 + I_A + I_D E \alpha \frac{1}{S_1} \frac{\varepsilon_{\lambda A}^D \varepsilon_{\lambda D}^A}{\varepsilon_{\lambda D}^D \varepsilon_{\lambda A}^A}
\end{aligned} \tag{6}$$

Ahol az I_1 - I_3 az egyes csatornák háttérkorrigált intenzitásai, az S_1 és S_3 a donor átvilágítási faktora a donor csatornából a FRET csatornába, illetve az akceptor csatornába, melyet csak a donorral jelölt mintából számolunk, és az alábbiaknak megfelelően határozzuk meg:

$$S_1 = \frac{I_2^D}{I_1^D}, \quad S_3 = \frac{I_3^D}{I_1^D} \tag{7}$$

Az S_2 és S_4 értékek a kizárólag akceptorral jelölt minta segítségével határozhatók meg, és megmutatják az akceptor átvilágítását a FRET, illetve a donor csatornába, melynek kiszámítása a következőképpen lehetséges.

$$S_2 = \frac{I_2^A}{I_3^A}, \quad S_4 = \frac{I_1^A}{I_3^A} \tag{8}$$

Az I_D mutatja a donor kioltatlan, míg az I_A a közvetlenül gerjesztett akceptor intenzitását. Az ε a felső indexben jelölt molekula (a donor vagy az akceptor) moláris abszorpciós koefficiense, az alsó index azt jelöli, hogy a donor vagy az akceptor gerjesztési hullámhosszán kell értelmezni. Az α értéke mutatja meg egy gerjesztett akceptor molekula intenzitását a FRET csatornában egy donor csatornában detektált gerjesztett donorhoz képest a következő egyenlet szerint:

$$\alpha = \frac{Q_A \eta_{A2}}{Q_D \eta_{D1}} \tag{9}$$

ahol a Q_A és a Q_D az akceptor és donor fluoreszcencia kvantumhatásfoka, és a η_{A2} és a η_{D1} a FRET csatornában detektált akceptor foton, illetve a donor csatornában detektált donor foton detektálási hatékonyságát jellemzi [23], [24]. Mivel mind a kvantumhatásfokot, mind a detektálási hatékonyságot nehéz meghatározni, ezért az α faktor meghatározására mind a citometriás mérések, mind a mikroszkópos mérések esetén számos módszer létezik, ami nem tartalmazza a fent említett változókat [13], [24], [25]. Egy akceptor foton detektálási hatékonysága a FRET csatornában összehasonlítható egy donor foton detektálási hatékonyságával a donor csatornában azáltal, hogy az egyik mintát egy donorral konjugált, egy bizonyos epitópra specifikus antitesttel jelöljük, még egy másik mintát ugyanarra az epitópra specifikus, akceptorral jelölt antitesttel jelölünk. Ha figyelembe vesszük a moláris

abszorpciós koefficiens és a jelölési arányt (fluorofórok átlagos száma egy antitesten egy antitest törzsoldatban), akkor az α a következő egyenlet szerint meghatározható:

$$\alpha = \frac{M_A \varepsilon_D^D L_D}{M_D \varepsilon_A^D L_A} \quad (10)$$

ahol M_A az akceptorral jelölt minta intenzitása a FRET csatornában és az M_D a donorral jelölt minta donor csatornában mért intenzitása. Az ε_D^D és ε_A^D a donor, ill. az akceptor moláris abszorpciós koefficiense a donor gerjesztési hullámhosszán, az L_D és L_A a donorral, illetve az akceptorral jelölt antitest jelölési aránya. Ahhoz, hogy a módszer megbízható legyen, a mérések során nagy mennyiségű sejtet kell vizsgálnunk. A moláris abszorpciós koefficiensek spektrofotometriásan határozhatóak meg [23]. A fent említett egyenletrendszerek alapján a FRET a következőképpen határozható meg [26].

$$E = \frac{S_2 (I_2 - I_1 S_1 - I_3 S_2 + I_1 S_2 S_3 + I_3 S_1 S_4 - I_2 S_3 S_4)}{\alpha \left(\frac{\varepsilon_{635}^D \varepsilon_{488}^A}{\varepsilon_{488}^D \varepsilon_{635}^A} \right) (I_2 S_4 - I_1 S_2) + S_2 (I_2 - I_1 S_1 - I_3 S_2 + I_1 S_2 S_3 + I_3 S_1 S_4 - I_2 S_3 S_4)} \quad (11)$$

Annak ellenére, hogy az energiatranszfer hatásfok kiszámítására ilyen szisztematikus módszert alkalmazunk, meghatározása mégis nehéz alacsony expressziós szintű fehérjék esetében. Azokban az esetekben, amikor a jel-zaj arány nagyon alacsony, a pontos FRET számításokhoz sejtenkénti autofluoreszcencia korrekcióra van szükség, továbbá olyan FRET-pár kiválasztására, mely nagyobb emissziós hullámhosszal rendelkezik. Ezek segítenek csökkenteni a FRET hisztogramok szórását, ezáltal a FRET analízisek érzékenységét javítják [27]–[29].

1.2.1.3.3. Spektrális FRET mérések

A spektrális képalkotás különböző emissziós hullámhosszokon készített fluoreszcens képek sorozatát jelenti, aminek köszönhetően így hullámhossz szerinti képsorozatokot (ún. „lambda stack-eket”) kapunk. Az eljárás feltételezi azt, hogy minden fluorofórnak specifikus spektrális jele van, ami a hullámhossz szerinti képsorozatban azonosítható. A módszer a mikroszkópos rendszer azon képességén alapszik, hogy a gerjesztett mintából kibocsátott fény spektrális komponensei elkülöníthetőek legyenek [9], [30], [31]. Ez a módszer a legtöbb lézer pásztázó konfokális mikroszkóp esetében elérhető, és lehetőséget biztosít a donor és akceptor intenzitásváltozásainak nyomon követésére, például a FRET esetében bekövetkező változások során. A FRET detektálásakor legalább egy spektrumot kell felvenni, ami mind a

donor, mind az akceptor emisszióját lefedi a donor gerjesztésekor. Egy második spektrum, amely lefedi az akceptor emisszióját annak gerjesztésekor, információt nyújt az akceptor mennyiségéről. Mivel az akceptor jel és a FRET jel azonos hullámhosszfüggést mutat, ezért spektrális dekonvolúcióval nem különíthetők el. Bizonyos kísérletek arról számolnak be, hogy a spektrális képalkotás nem érzékeny az autofluoreszcenciára és a nagymértékű spektrális átfedésre, mivel az egyes résztvevő fluorofórok szétválaszthatóak [21], [31].

1.2.1.4. Donor fotoelhalványítás

A donor fotoelhalványítás kinetikájának mérése akceptor jelenlétében és akceptor jelenléte nélkül egyszerűen elvégezhető FRET méréseket tesz lehetővé [32]. A fotoelhalványítás másodpercektől percekig tartó időintervallumot ölelhet fel, ami 10 nagyságrenddel lassabb, mint a nanoszekundumos fluoreszcencia emisszió. Ez az idő általában elegendő a molekulák elhalványításához, bár ha nagyobb intenzitású gerjesztő fényt alkalmazunk, ez az idő mikroszekundumos nagyságrendre csökkenthető [7]. A donor fotoelhalványításos kísérletekhez egy fotolabilis donorra és a nem feltétlenül fluoreszcens, de fotostabil akceptorra van szükség. A donor elhalványításának detektálása a FRET kvantitatív analízisét teszi lehetővé, mely során a donor stabilitása az akceptor jelenlétében megnő. Ezért az elhalványítási időállandó nő, tehát a donor teljes elhalványítása több időt fog igénybe venni [21]. A donor fotoelhalványítás időállandója fordítottan arányos a donor kvantumhatékonysággal, ezért az ilyen mérések során két különböző minta (egy donorral jelölt, és egy donorral és akceptorral jelölt) ugyanolyan körülmények között mért átlagos fotoelhalványítási időállandóját hasonlítjuk össze [4], [26]. A donor fotoelhalványításos módszerrel a FRET a következő egyenlettel határozható meg:

$$E = 1 - \frac{T_D}{T_{DA}} \quad (12)$$

ahol a T_D és a T_{DA} a donor fotoelhalványításának időállandója az akceptor hiányában, illetve jelenlétében. Az időállandó meghatározásához a donor mintáról sorozatban veszünk fel képeket, miközben folyamatosan égetjük a mintát addig, amíg a mért intenzitások a háttér értékkel lesznek egyenlők [9].

1.2.2. Fluoreszcencia élettartam mérések

A fluoreszcencia élettartam azt az időt jellemzi, amelyet a fluoreszcens molekulák átlagosan a gerjesztett állapotban töltenek, mielőtt alapállapotba kerülnek különböző radiatív, illetve non-radiatív mechanizmusok közreműködésével. A folyamat random voltából következik a fluoreszcencia intenzitás exponenciális csökkenése a gerjesztés kikapcsolását követően, ill. az, hogy a fluoreszcencia élettartam egyenlő azzal az idővel, amely alatt a gerjesztett molekulák populációja e -ad részére csökken [33]. A fluoreszcencia élettartam fordítottan arányos a relaxációs folyamatok (fluoreszcencia emisszió, FRET és minden más nem fluoreszcens folyamat) sebességi állandóinak összegével [34]. A fentiekből következik, hogy ha a megfelelő akceptor a potenciális donor közelében van, akkor a donor fluoreszcencia élettartama csökken a FRET miatt. Az élettartammérések alapján a FRET az alábbi egyenlettel meghatározható:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (13)$$

ahol a τ_{DA} és τ_D a donor fluoreszcencia élettartama az akceptor jelenlétében illetve az akceptor jelenléte nélkül [21]. A fluoreszcencia élettartam meghatározására két rutinszerűen alkalmazott módszert ismerünk. Az egyik az időfüggő mérések (TCSPC – time-correlated single photon counting), melyben a rövid lézerimpulzust követően idő kapuzott detektor segítségével méri az egyedi fotonok emissziójának idejét. Kellő számú ilyen esemény megfigyelése után előálló hisztogram a fluoreszcencia exponenciális időfüggő csökkenését mutatja [35]. A másik megközelítés a frekvenciafüggő módszer, amelyben modulált gerjesztő fénnel gerjesztik a mintát, és vizsgálják az emisszió gerjesztőfényhez képesti fáziskésését, valamint az emisszió demodulációját [36]. Fluoreszcencia élettartamon alapuló FRET (fluorescence lifetime FRET, FL-FRET) vizsgálatokat mikroszkóppal, spektrofluoriméterrel vagy citométerrel is végezhetünk [9]. A fluoreszcencia élettartam mikroszkópos FRET (FLIM-FRET) mérések nem igényelnek korrekciós faktorokat, mint az akceptor szenzitized emisszió esetében, illetve nem érzékenyek a fluorofór koncentráció változására és a megvilágító fény intenzitására, fényszórásra vagy a fotoelhalványításra. A FLIM-FRET módszer képes százalékosan megbecsülni a FRET-ben részt vevő, illetve nem részt vevő donorok arányát [37]. Mindezek ellenére az FL-FRET mérések hosszú időt vesznek igénybe, és igen érzékeny és drága műszerezettséget igényelnek.

1.2.3. Fluoreszcencia anizotrópia mérések

A fluorofórok térben és időben véletlenszerűen orientáltak. Ha polarizált fénnel világítjuk meg őket, akkor a teljes fluorofór populációnak csak egy része kerül gerjesztett állapotba, mivel csak azok a fluorofórok fognak gerjesztett állapotba kerülni, melyek abszorpciós dipólusa megfelelően párhuzamos a gerjesztő fotonok polarizációs irányával. Ezt a folyamatot hívjuk fotoszelekciónak. Továbbá a gerjesztett állapotban lévő fluorofórok orientációja véletlenszerűen megváltozik, mielőtt elveszítenék az energiájukat sugárzással vagy sugárzásmentesen, például a FRET-tel. Következtetésként elmondható, hogy a kibocsátott fény depolarizált a gerjesztő fényhez viszonyítva [1]. A fluoreszcencia anizotrópia (r) megmutatja, hogy polarizált megvilágítást követően az emittált fluoreszcencia mennyire polarizált. A fluorofórt vertikálisan polarizált fénnel megvilágítjuk, majd ezt követően mind a vertikális (I_V), mind a horizontális (I_H) emissziókat össze kell gyűjteni. Az emisszió depolarizációjához vezető folyamatokat ezen két intenzitás alapján jellemezhetjük, és az anizotrópia a következő egyenlet szerint meghatározható.

$$r = \frac{I_V - I_H}{I_V + 2 I_H} \quad (14)$$

A fenti képlet csak akkor lenne kísérletesen alkalmazható, ha a detektorrendszer ugyanolyan hatékonysággal tudná detektálni a vertikálisan és horizontálisan polarizált emissziót. Mivel ez nincs így, ezért egy, általában G -vel jelölt paraméterrel figyelembe kell venni, hogy a detektorrendszer hányszor érzékenyebb a vertikálisan polarizált fény detektálására:

$$r = \frac{I_V - G I_H}{I_V + 2 G I_H} \quad (15)$$

A G faktor meghatározásának egyik leggyakrabban alkalmazott módszerében a mintát horizontálisan polarizált fénnel világítják meg, és ezt követően mérik az emisszió vertikális (I_{V2}) és horizontális (I_{H2}) komponensét. Mivel a két komponens elméleti nagysága megegyezik, a mért különbségük a detektorrendszer vertikálisan és horizontálisan polarizált fényre vonatkozó eltérő érzékenységét jellemzi:

$$G = \frac{I_{V2}}{I_{H2}} \quad (16)$$

Elméletileg maximális anizotrópia akkor érhető el, amikor az emissziós átmeneti dipólus momentum tökéletesen párhuzamos az abszorpciós átmeneti dipólus momentummal [2]. Az anizotrópia érzékeny a molekulák méretére és alakjára, a molekuláris környezet merevségére

és folyékonyságára, a forgó mozgásra, illetve a molekuláris asszociációs eseményekre [10]. A FRET szintén hatással van a fluorofórok anizotrópiájára. A hetero-FRET-nek köszönhetően a donor élettartama csökken, ezáltal a donornak gerjesztett állapotban kevesebb ideje van forogni. Levonható az a következtetés, hogy a donor emissziója hiperpolarizálódik (ahhoz az esethez képest, ahol nincs hetero-FRET), ami megnövekedett anizotrópiát fog eredményezni. A homo-FRET nem befolyásolja a donorpopuláció élettartamát, hanem hasonló molekulák közötti energiaátadáshoz vezet. Bár a FRET kölcsönhatás során a donor emissziós dipólusával párhuzamosan álló abszorpciós dipólussal rendelkező akceptorok preferenciálisan gerjesztődnek, mégis minden homo-FRET lépés a gerjesztett molekulapopulációt depolarizálja, mert a fenti orientációszelektív hatás viszonylag gyenge. Mivel a donor és az akceptor molekula spektroszkópiailag megegyezik, ezért az emisszió kevésbé polarizált, aminek köszönhetően az anizotrópia csökken. Fontos megjegyezni, hogy hetero-FRET esetén a donor fluoreszcencia intenzitása és az élettartama csökken, még a homo-FRET esetében változatlan marad a donorpopulációra vonatkozóan [10], [11].

1.3. Antitestek jelölési módszerei, a jelölés hatása az antitestekre

Az antitestek vagy ellenanyagok az adaptív immunrendszer fehérjéi, melyek effektor funkciókat látnak el, képesek specifikusan megtalálni célmolekulákat, illetve a betegséget okozó organizmusokat. Ezen tulajdonságuk tette lehetővé, hogy napjainkban a biológiai kutatások szerves részévé váljanak. Széles körben alkalmazzák őket a diagnosztikában és a kutatásban, illetve a klinikumban fontos terápiás eszközzé váltak különböző betegségek kezelésében. Az antitesteket egyaránt használhatják elemzésekre, tisztításra illetve különböző fiziológiás válaszok közvetítésére és befolyásolására [38], [39]. Az ellenanyagok két könnyű és két nehéz polipeptidláncból állnak, melyeket diszulfid hidak és nem kovalens kötések stabilizálnak. Az ellenanyagok N-terminális (Fab) része tartalmazza a nehéz és könnyű láncok variábilis szekvenciáit, melyek antigén kötőhelyként szolgálva képesek felismerni az antigének különböző epitópjait. A C-terminális részek a konstans szekvenciákat (Fc) tartalmazzák, amik effektor funkciókat képesek ellátni [40]. Nehéz láncuk konstans régióinak szekvenciái alapján öt izotípust különböztetünk meg (IgG, IgA, IgD, IgE, IgM). Termelődésük módja alapján megkülönböztetünk poli- és monoklonális antitesteket. A poliklonális antitesteket több B-sejt klón termeli, és egy adott antigén különböző epitópjaira specifikusak, melyeket gyakran alkalmaznak patogének kimutatására. Azokban az esetekben,

amikor nagy specificitású kötődést szeretnénk elérni, akkor monoklonális antitestek alkalmazása szükséges. Ezek az antitestek egy antigén egy adott epitópjára specifikusak. A monoklonális antitestek hibridóma technikával állíthatók elő, amikor ellenanyagot termelő B-sejteket fuzionáltatnak myeloma sejtekkel, melynek következtében antitestet szekretáló, immortalizált sejtvonalat kapunk. A folyamat során általában sok hibridóma klón jön létre, melyeket tovább vizsgálunk azért, hogy azonosítsuk a megfelelő monoklonális antitest termelő sejteket [41].

Mivel az antitestek aminosav polimerek, melyek számtalan oldallánccal rendelkeznek, így ezek az oldallancok meghatározóak a konjugációs folyamatok során [42]. Az ilyen konjugációs technikák esetében a speciális tulajdonsággal, mint pl: fluoreszcenciával rendelkező kis molekula kovalensen kötődik egy fehérjéhez, DNS-hez vagy más biomolekulához [43]. A fehérjéken általában három funkciós csoportot: amino- ($-NH_2$), tiol- ($-SH$), és szénhidrátcsoporthat használnak a kovalens módosításokhoz [44]. A legközkedveltebb reaktív csoport az amino csoport, mert ezek nagy mennyiségben vannak jelen az antitestek felszínén. A fehérjét alkotó aminosavak 10%-át kitevő lizin, arginin és hisztidin az a három fő aminosav, ami amin oldallancokat tartalmaz, és közülük a lizin ϵ -amino csoportja módosítható. A szélesebb körben alkalmazott konjugációs módszer az amino csoportok konjugációja N-hidroxiszukcinimid-észterrel, mely stabil karboxamid kötést eredményez. Maga az egész folyamat nagyfokú pH függést mutat, hiszen a reakcióra csak a semleges, szabad bázis képes. Ezért a lizin maradékok módosítására az optimális pH: 8,5-9,5.

Az aminocsoportokon keresztüli konjugációs módszer mellett a szulfhidril csoport célzott jelölése is közkedvelt, a maleimiddel szembeni specificitása és magas reakcióképessége miatt. Mivel a legtöbb tiol csoport a ciszteinekben található, mely diszulfid hidakat alkot az antitestek nehéz láncai, illetve könnyű- és nehézláncai között, az antitestek normál állapotban nem tartalmaznak szabad tiol csoportokat. Ezért jelölhető csoportok létrehozása miatt a diszulfid hidak redukálása szükséges, amit a ditiotreitolt (DTT) vagy 2-merkaptóetilamin (MEA) használatával érnek el. Ezt követően az antitestek tiolált fragmentjeihez tioészter kötéssel a maleimidek könnyedén kötődhetnek.

Ezen módszerek mellett szintén alkalmazzák konjugációs folyamatokhoz az antitestek Fc részén elhelyezkedő szénhidrát csoportokat. Ezek a csoportok normál esetben nem elérhetőek a festékek számára. Ezért olyan vegyszereket, mint pl.: nátrium-perjodátot ($NaIO_4$), használnak, amelyek redukálják a cukor maradékok hidroxil csoportjait. Ezt követően a hidrazidot, vagy hidroxilamint tartalmazó reagensek kovalensen kapcsolódhatnak

az antitesthez [42], [45], [46]. Bár a jelölt funkciós csoport antigénkötő helytől való nagyobb távolsága miatt a szénhidrát csoport jelölésének kellene a legkisebb hatást gyakorolnia az antitest affinitására, a kísérleti eredmények szerint mégis az ilyen módon jelölt antitestek epitóp iránti K_d -je a legnagyobb [47]. Ennek valószínű oka az, hogy a szénhidrátcsoporthoz való kötődés az antitest konformációját vagy dinamikáját, melyek szükségesek az antigénhez való kötődéshez [48]. Ezért az amino csoportokkal történő reakció a legjobban preferált konjugációs módszer az egyszerű kivitelezhetőség, a gyorsabb reakciókinetika, az olcsóság és a magas festék-antitest konjugátum kihozatal miatt [47], [49].

Az ideális jelölési reakció során az antitesteknek meg kell őrizni az aktivitásukat és a jelölési specificitásukat. Sajnos a gyakorlatban nincs olyan konjugációs folyamat, ami során ez maradéktalanul teljesülne, és kompromisszumot kell kötni a jelölő molekula kimutatásának maximalizálása és az ellenanyag affinitásának megőrzése között [50]. Az antitest jelölése megváltoztathatja az antigén kötő karakterisztikáját, illetve extrém esetben teljesen inaktívvá teheti az antitestet [51].

Az antitesteken lévő fluoreszcens festékmolekulák átlagos számát a jelölési arány ($DOL = \text{Degree Of Labeling}$) vagy más néven a F/P (fluorofór/protein) értéke mutatja meg. Ezeket az értékeket a fluoreszcens mérések kvantitatív kiértékeléséhez gyakran szükséges megadni. Mivel az F/P értékét egy antitest törzsoldatra szokták meghatározni, ez megtévesztő lehet, mert az antitest törzsoldatban lévő egyes antitestek több, míg mások kevesebb konjugált festékkel rendelkeznek. Tehát a konjugációs eljárások során keletkező jelölt antitest populációban az egyes antitestek eltérő festékmolekula számmal rendelkeznek, melynek eloszlását Poisson eloszlással jellemezhetjük:

$$P(k) = \frac{DOL^k}{k!} e^{-DOL} \quad (17)$$

ahol a DOL az antitest törzsoldat átlagos jelölési aránya, $P(k)$ a k darab fluorofórral konjugált antitest előfordulási valószínűsége [51]. A Poisson eloszlás akkor alkalmazható a $P(k)$ leírására, ha a várható értéket (DOL , ami a Poisson eloszlás λ paramétere) $n \cdot p$ szorzattal elő lehet állítani, ahol a konjugációs reakciók szempontjából n a jelölhető aminosavak száma, p pedig az egyes csoportok sikeres konjugációjának a valószínűsége. A fenti egyenlet érvényessége azt feltételezi, hogy az antitestben levő nagyszámú jelölhető csoport mindegyike ugyanolyan valószínűséggel jelölhető, hogy az egy antitestben bekövetkező egyes konjugációs reakciók nem befolyásolják egymást. Mivel a fenti feltételek közül egyik sem érvényes tökéletesen a jelölési reakcióra, ezért a fenti egyenlet csak közelítésnek fogható fel. Ennek

ellenére mégis gyakran alkalmazzák kvantitatív elemzésekben a tökéletesebb leírás hiánya miatt [51]–[54].

1.4. Az antitest jelölés hatása a fluorofórokra

Annak ellenére, hogy a fluoreszcens jelölést napjainkban széles körben alkalmazzák magas detektálási hatékonysága miatt, mégis vannak korlátai [55]. A fluoreszcencia önkkioltást ugyanazzal a fluorofórral többszörösen jelölt biomolekulák esetében írták le, mely során a jelölt molekula fényessége nem arányos a jelölés mértékével. Ezt a fluorofórok csoportokba rendeződésének tulajdonítják, ami a jelölés során a biomolekulához kötődő aggregátumként jelentkezik. Az aggregátumok képződése a legtöbb aromás π -konjugált szénhidrogén fluoreszcencia kioltásának fontos oka [56]. Ezt a problémát legtöbbször a fluoreszcein és a rodamin festékek estében figyelték meg, de jelen van egyéb festékek esetében is. Ez az eset a gerjesztési és emissziós spektrumok vizsgálatával megérthető. Bizonyos fluorofórok esetében az abszorpciós és emissziós spektrumok között kicsi a Stokes-féle eltolódás, így amikor egy fehérjéhez több festékmolekula kötődik, energiatranszfer játszódhat le közöttük, ha a távolságuk a Förster távolságon belül van. A nagymértékű Stokes-féle eltolódás minimalizálja a homotranszfer jelenlétét [1]. A homo-FRET akkor vezet fluoreszcencia kioltáshoz, ha az energiatranszfer nem fluoreszcens fluorofórok felé zajlik. Emellett számos más tényező is szerepet játszik a fluoreszcencia intenzitás csökkenésében túljelölés esetén, mint pl. festék molekulák dimerizációja és festék monomerek közötti ütközéses kioltás.

A kioltás mechanizmusa lehet statikus és dinamikus. A két típus abban különbözik egymástól, hogy a fluoreszcencia intenzitás csökkenése a fluoreszcencia élettartam rövidülésével jár-e. Dinamikus vagy ütközési kioltás esetében a fluorofór a gerjesztett állapotában ütközik a kioltóval. Mivel ilyenkor egy újabb relaxációs folyamat jelenik meg, a folyamat a fluoreszcencia élettartam rövidülésével jár. Ezzel szemben a statikus kioltás esetén a kioltó már a fluorofór alapállapotában komplexet alkot vele, és a kialakult komplex elveszti fluoreszcens tulajdonságát. A teljes fluorofór populációban mérhető kioltás mértékét a fluorofór és a kioltó disszociációs egyensúlya befolyásolja. Mivel ebben az esetben a kioltóval komplexet nem képező fluorofórok „érintetlenek” és csak ők felelősek a fluoreszcencia megmaradó részéért, a statikus kioltás nem jár a fluoreszcencia élettartam csökkenésével [57], [58].

A festékek ezen tulajdonsága azonban nem mindig hátrányos, sikeresen használják membránfúzió, protein dimerek kialakulásának, illetve különböző proteázok és nukleázok aktivitásának mérésére, illetve fehérjeszerkezet vizsgálatokra [59].

1.5. További fluoreszcens jelölési módszerek

1.5.1. Fluoreszcens proteinek

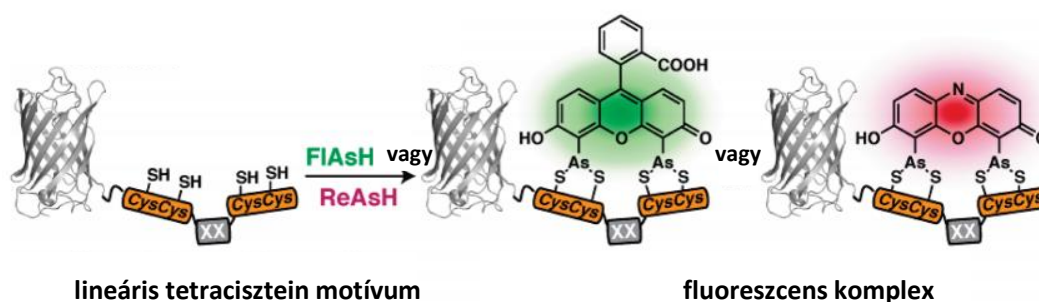
A célmolekula fluoreszcens jelzőmolekulával történő rekombináns fúziója lehetővé tette a biológiai folyamatok időbeni követését nem invazív módon a különböző sejt kompartmentekben. A fluoreszcens proteinek (FP) alkalmazása élő sejtek, illetve egy teljes állat vizsgálata esetén nagyon előnyös, mert a FP-k olyan genetikai jelölő molekulák, melyek a transzgénikus sejtben vagy állatban kifejeződnek, és képesek láthatóvá tenni az általunk vizsgálni kívánt molekulát bármilyen külső ágens, fixálás vagy permeabilizáció nélkül, melyek az immunfluoreszcens jelölés esetében elengedhetetlen eszközök. Az FP génjét fuzionáltatjuk a célfehérje génjével, aminek köszönhetően 1:1 arányban fejeződik ki a célmolekulával, ennek köszönhetően ideális a kvantitatív képalkotáshoz. A fluoreszcens fehérjéket széles körben alkalmazzák a következő tulajdonságaik miatt: 1.) nem toxikusak az élő sejtekre, és kifejeződésük nagyon hatékony; 2.) az utóbbi időben rendkívül sokféle színben váltak elérhetővé, így egyszerre többféle célfehérjét lehet egymástól függetlenül megjelölni; 3.) fiziológias körülmények között hosszan fotostabilak maradnak; 4.) általában nem vagy csekély mértékben módosítják a jelölt fehérje funkcióját. A szerves fluorofórokhoz hasonlóan ma már széles körben választhatunk különböző fluoreszcens fehérjékből, melyek a látható spektrum teljes palettáját lefedik. A leggyakrabban alkalmazott fluoreszcens proteinek a zöld fluoreszcens proteinek (GFP) és azok származékai [60]–[63]. Az eredeti zöld fluoreszcens fehérjét a korai 1960-as években fedezték fel az *Aequorea victoria* medúza biolumineszcens folyamatait vizsgálva, amiből az aequorin kék fényt emittáló fehérjét, illetve a GFP-t izolálták. Az aequorin és a GFP az *A. victoria* világító szerveként együttműködnek, hogy a Ca^{2+} indukált lumineszcens jelet átalakítsák a fajra jellemző zöld lumineszcens jellé. A medúzából származó vad típusú GFP-t alkalmazzák kék (BFP) és sárga (YFP) fluoreszcens proteinek előállítására mutagenézissel. A zöld fluoreszcens proteinek azonban mégis vannak korlátai. Úgy találták, hogy érzékeny a pH-ra és a klorid ionra, 37 °C-on kisebb az

expressziója és a fotostabilitása a biológiai mikroszkópia körülményei között nem kielégítő. A GFP mutációinak eredményeképpen a fehérjék előnyösebb tulajdonságokra tettek szert, fényesebbek és fotostabilabbak lettek, magasabb kvantumhatékonysággal és moláris abszorpciós koefficienssel rendelkeznek és a spektrumukat (színüket) is sikerült a látható tartomány különböző részeire kiterjeszteni. Ilyen GFP variáns például az EGFP (enhanced GFP), amely megnövekedett stabilitással és fényességgel rendelkezik. Az így létrehozott, az eredeti GFP-ből származó FP variánsok különböző homodimerizációs hajlammal rendelkeznek. Ez a tulajdonság nagyon hátrányos lehet akkor, ha a célfehérje klaszterizációját kívánjuk tanulmányozni. Leginkább a YFP (yellow fluorescent protein) érintett, de kisebb mértékben a többi variáns is. Mivel ez a tendencia az A206K mutációval nagyrészt kiküszöbölhető, manapság elsősorban ilyen variánsokat alkalmaznak, amit a fehérje neve elé tett „m” betűvel jeleznek (pl. mYFP).

További kutatások eredménye, hogy más fajokból (korallak, rákok, lándzsahalak) újabb fluoreszcens fehérjéket izoláltak, melyek más spektrális tartományokat fednek le, mint pl. a narancs, piros, és távoli-vörös régiókat [62], [64]. A korallokból származó fehérjék felfedezése nem csak azért nagyszerű, mert több szín elérhető és így több molekula egyszerre történő jelölését biztosítja, hanem azért is, mert hosszabb hullámhosszon a fényszóródás, a háttér elnyelése és fény kibocsátása jelentősen csökken. Így lehetővé válik többsejtű organizmusok mélyebb rétegeiben történő képalkotás kisebb mértékű torzítással és jobb kontraszttal [65]. A modern vörös fluoreszcens fehérjéket (RFP), melyek emissziós maximuma akár 600 nm fölött is lehet, öt fő csoportba soroljuk: 1-2.) hagyományos és hasított (az eredeti fluoreszcens fehérje fragmentjeiből felépülő, új rekombináns, kisebb méretű fluoreszcens fehérje) narancs, piros és távoli vörös FP-k; 3.) nagy Stokes-féle eltolódással rendelkező RFP-k; 4.) fluoreszcens időzítő; és 5.) fotoaktiválható FP-k. A fluoreszcens időzítő fehérjék esetében színváltozás következik be a kromofór kémiai átalakulása miatt. A fluoreszcencia-átmenet kiszámítható időbeli lefolyása lehetővé teszi a tér- és időbeli molekuláris események elemzését a két szín fluoreszcencia intenzitásának aránya alapján. Ezzel szemben a fotoaktiválható vörös fluoreszcens proteinek (PA-RFP, photoactivatable RFP) megváltoztatják a tulajdonságaikat bizonyos hullámhosszúságú besugárzások hatására [60], [66].

1.5.2. Fehérjéhez kapcsolt rövid szekvencia jelölése kémiai specificitás alapján

Annak ellenére, hogy a fluoreszcens fehérjék továbbra is egyedülálló eszközt nyújtanak az élő sejtek vizsgálatára, alkalmazásuk mégis korlátozott elég nagy méretük miatt, ami a fehérje interakciók növekvő és egyre kifinomultabb dinamikus mérései során hátrányt jelent. A kémiai jelölés felfedezésével egy élő sejtekben kivitelezhető, kémiai próbákkal történő alternatív fehérje jelölési módszert kaptunk. A kémiai jelölés során a célfehérjét nem egy fluorofórral, hanem egy polipeptiddel jelölik meg, amit ezt követően szerves fluorofórral módosítanak. Erre egy olyan fúziós plazmidot használnak, mely kódolja a célfehérjét és a kémiai jelölőt egyaránt, majd a megfelelő sejteket transzfektálják. Ezt követően szerves fluorofórokkal inkubálják őket, így a fluorofór bejuthat a sejtbe, és kötődhet a kémiai jelzéshez. A folyamat eredményeként a genetikai kódoltságnak köszönhetően a fehérjelölés megtartja specificitását, de sokkal kisebb méretű és erősebb kémiai jelölést tesz lehetővé magasabb foton kihozatal mellett [67]. 1998-ban Tsien és a munkatársai kimutatták, hogy ez a módszer megvalósítható egy lineáris tetracisztein aminosav-szekvencia (Cys-Cys-X-X-Cys-Cys) két arzénatommal módosított fluorescein molekulával (FlAsH, fluorescein arsenical hairpin binder) történő jelölésével. A másik leggyakrabban alkalmazott kémiai jelölő a ReAsH (resorufin arsenical hairpin binder). A FlAsH-t és a ReAsH-t etánditiollal (EDT) nem fluoreszcens komplexként alkalmazzák, viszont amikor a tetracisztein motívum négy tioljához kötődnek, fluoreszcenssé válnak. Ha a CCXXCC szekvencia a fehérje N- vagy C-terminális részén helyezkedik el, akkor a kémiai jelölők lehetővé teszik a fehérje szubcelluláris lokalizációjának meghatározását fluoreszcens mikroszkóp segítségével [68], [69]. Bár a jelölési reakció közlését nagy lelkesedéssel fogadta a tudományos közösség, az utóbbi időben elég kevés alkalmazását közölték, aminek valószínű oka a gyenge jelölési hatékonyság, a toxicitás és a következményes alacsony reprodukálhatóság.



2. ábra: Fluoreszcens komplex kialakulása két arzén atomot tartalmazó fluorofór illetve a vizsgálandó fehérje között [68].

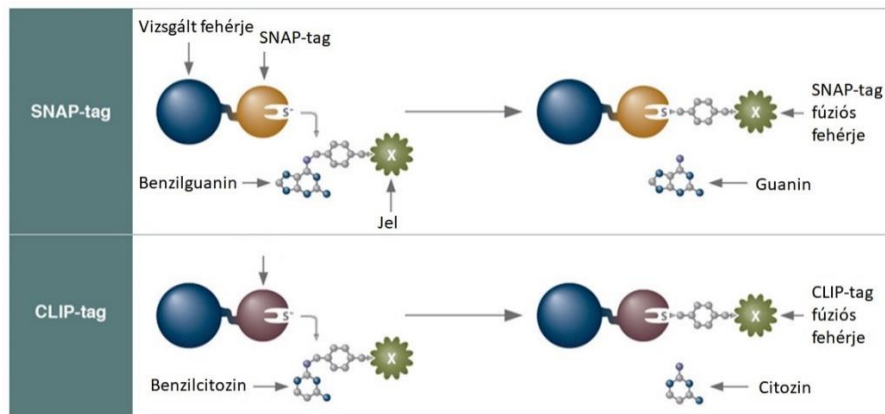
1.5.3. Fehérjéhez kapcsolt szekvenciák enzimatikus jelölése

Az előző pontban ismertetett jelölési módszer korlátai miatt egy olyan új módszert alkottak a célfehérjék kovalens jelölésére, melyben egy kis organikus molekulát alkalmaznak célfehérjéhez fuzionált szekvencia („tag”) megjelölésére. Ez a technológia kombinálja a genetikailag jelölt fehérje előnyeit a szintetikus szerves molekulák sokoldalúságával. A módszer a célfehérje poszttranszlációs módosításán alapszik. A célfehérjét fuzionáltatják egy, az ACP-ből (acyl carrier protein) származó rövid szekvenciával („ACP-tag”). A kifejezett fúziós fehérjét fluoreszcens molekulával jelölik oly módon, hogy a szerves fluorofór koenzim A-val alkotott komplexéről a fluorofórt a foszopantetein transzferáz (PPTáz) aktivitással rendelkező ACP szintáz a fúziós fehérjében levő ACP szekvenciában levő szerinhez kapcsolja [70]–[72]. Mivel a PPTáz enzim számára szinte tetszőleges fluorofórral módosított koenzim A szubsztrátként szolgálhat, a folyamat lehetővé teszi az ACP fúziós fehérje specifikus megjelölését sokféle színű festékkel [71]. Maga a jelölési reakció gyors és specifikus. Két különböző szekvencia és PPTáz enzim kombinálásával szekvenciális jelölés érhető el különböző fluorofórokkal ugyanazon mintában. Ehhez a sejtben két fehérjét kell genetikailag módosítani, az egyiket a már említett ACP szekvenciával (ACP tag), a másikat egy ún. MCP tag-gel, ami az előzőtől két aminosavban különbözik. Ezt követően a sejteket az első festék koenzim A-val alkotott komplexével és az ACP szintáz enzimmal inkubálják. Mivel az ACP szintáz az MCP tag-et nem képes megjelölni, így az első festékkel csak az ACP tag kerül megjelölésre. Ezt követően a sejteket a második fluorofór koenzim A-val alkotott komplexével és az SFP szintázzal inkubálják. Bár az SFP szintáz mind az ACP, mind az MCP

tag-et képes jelölni, az előző reakcióban az ACP szekvenciákat már megjelöltük, ezért a második fluorofórral csak az MCP tag jelölődik [70], [73]. Mivel a PPTáz aktivitással rendelkező enzim a kísérlet során kívülről adjuk a sejtekhez, az eljárás csak sejtfelszíni fehérjék extracelluláris doménjének módosítására alkalmas. Ennek ellenére elmondható, hogy ez a jelölési módszer a sejtfelszíni fehérjék vizsgálatának fontos eszközévé vált, és jól alkalmazható a fluoreszcenciás képalkotásban.

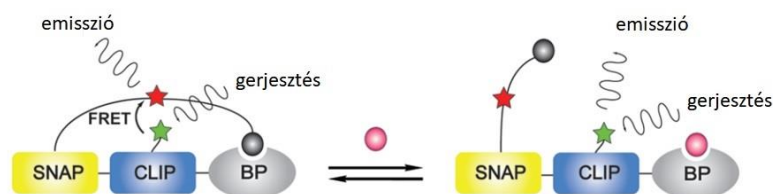
1.5.4. Önjelölésre képes protein domének

Ebben a jelölési technikában egy olyan fehérje domént fuzionáltatnak a célfehérjével, amely egy megfelelően módosított fluorofórral önmagát képes megjelölni. Így, szemben az előző fejezetben ismertetett módszerrel, külső enzim nem kell a jelölési reakció során alkalmazni. Ezért nemcsak sejtfelszíni, hanem intracelluláris jelölésre is alkalmazható. Az eljárás specifitása és biokompatibilitása miatt a bioortogonális kémiai jelölések közé tartozik. Ezen a területen a legszélesebb körben alkalmazott kémiai jelölés a SNAP-jelzés, más néven SNAP-tag. A SNAP-tag a humán O6-alkilguanin-DNS-alkiltranszferáz (hAGT), egy 20 kDa-os fehérje módosított változata, ami katalizálja az O6-alkilguanin kapcsolódását a fehérjén lévő ciszteinhez [74], [75]. Olyan mutáns AGT-t hoztak létre, amik fluorofórral jelölt szubsztrát származékokat képesek befogadni. Ezek a mutánsok alacsony DNS affinitással rendelkeznek, és a sejtfelszíni körülményekhez hasonló oxidáló környezetben is stabilak maradnak. A mai napig különféle extracelluláris és intracelluláris SNAP-tag-fúziós fehérjéket állítanak elő, és ezeket alkalmazzák szuperfelbontású képalkotásban és egyedi részecske követésben [76]. Továbbá egy másik AGT variáns, melynek elve ugyanaz, mint az előbbinek, benzil-citozint ismer fel szubsztrátként, melyet CLIP-jelzésnek vagy CLIP-tag-nek neveznek [77].



3. ábra: A SNAP- és CLIP-tag mechanizmusa. A SNAP- vagy CLIP tag fuzionál a vizsgálandó fehérjével, majd önjelölő mechanizmusa folyamán guanin vagy citozin szabadul fel (<https://international.neb.com/>)

Elmondható az, hogy a SNAP- és CLIP jelöléseket egyszerre is lehet alkalmazni, így lehetővé válik egy sejtben belül két különböző fehérje két különböző fluorofórral történő egyidejű vizsgálata [75]. A módszer fehérje-fehérje interakciók, illetve fehérjék konformációváltozásának vizsgálatát, illetve bizonyos anyagok jelenlétének kimutatását is lehetővé teszi FRET, illetve FRET-alapú bioszenzorok segítségével [78], [79]. Például fehérje-alapú bioszenzorok esetében a szenzor SNAP-tag, CLIP-tag, és egy kötőfehérje hármásából álló fúziós fehérje. A CLIP-jelöléshez egy szintetikus fluorofór kötődik, míg a SNAP-hez egy másik fluorofór és a kötőfehérje ligandja kapcsolódik. A természetes ligand hiányában az intramolekuláris ligand kötődik a kötőfehérjéhez, így a bioszenzort zárt állapotban tartja, melynek következtében magas FRET hatékonyságot detektálhatunk. Természetes ligand jelenlétében az intramolekuláris ligand nem kötődik, a bioszenzor nyílt állapotba kerül, a donor és akceptor molekula közötti távolság nő, melynek következtében csökkenő FRET hatékonyságot mérhetünk [78].



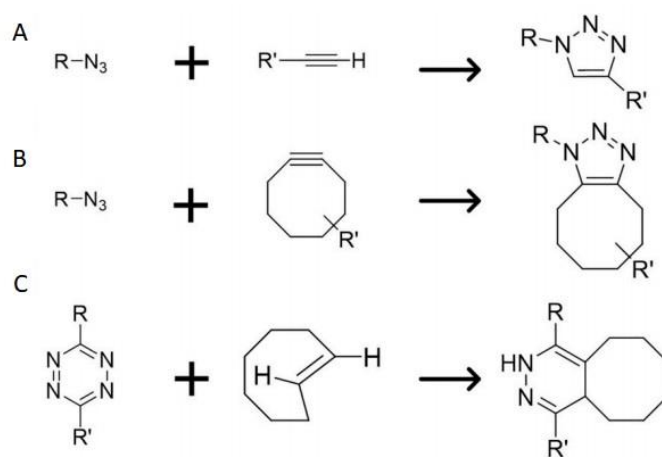
4. ábra: Fehérje alapú bioszenzorok. FRET jelenléte a szenzor nyitott és zárt állapotában [78].

1.5.5. Klikk kémia (click chemistry)

Fehérjék fluoreszcens jelzését általában kétféleképpen szokták végezni. Vagy tisztított fehérjét (pl. monoklonális antitestet) jelölnek meg fluoreszcensen *in vitro*, majd a fluoreszcensen konjugált fehérjét adják a sejtekhez, vagy a sejtek fehérjeit aspecifikusan jelölik meg *in situ*. A két eljárásban közös a kémiai jelölés aspecifitása. Felmerült az igény olyan magas kihozattal és specifitással rendelkező jelölési eljárásra, amely élő sejtekben is alkalmazható, és a jelölendő fehérje minimális perturbációját okozza. Az ilyen reakciók leírására a klikk kémia kifejezést először Sharpless és munkatársai használták 2001-ben [80]. Ezek a reakciók fiziológiás körülmények között történnek, és irreverzibilis kötések alakulnak ki. Jelentős előnyük más eljárásokkal szemben, hogy a módosítás során a fehérjébe beépülő jelölő molekula tömege kevesebb, mint 100 Dalton. Összehasonlításképpen a fluoreszcens fehérjék molekulatömege kb. 25 kDa, a SNAP-tagé kb. 20 kDa, az ACP tagé kb. 8 kDa. Széles körben alkalmazzák biomolekulák, mint pl. DNS, lipidek, fehérjék, különböző vegyületekkel történő módosítására. A klikk kémiai reakciók között, a réz (I)-katalizált azid-alkin 1,3-bipoláris cikloaddíciós (CuAAC) reakciót az élettudományok területén bioortogonális reakciókban használják [81], [82]. Ennek során a jelölendő biomolekulát alkin csoporttal jelölik, majd a fluoreszcens jelölést Cu(I) katalizátor jelenlétében végzik a fluorofór azid származékával. A reakció a funkciós csoportok felcserélésével is lejátszódhat, tehát aziddal jelölt biomolekulát meg lehet jelölni a fluorofór alkin csoporttal jelölt változatával. A kémiailag módosított fluorofór kereskedelmi forgalomban kapható, a problémát a jelölendő biomolekula alkin vagy azid csoporttal való módosítása jelenti. Ezt legtöbbször aziddal vagy alkinnal módosított monomerekkel (aminosav, nukleotid, cukor) érik el, amiket a sejt beépít a biomolekulákba [83]. A folyamatot metabolikus beépülésnek (metabolic incorporation) nevezik.

Mivel a fenti reakciótípus jelentős problémája a réz okozta toxicitás, Bertozzi és munkatársai kidolgozták a [3+2] azid-alkin cikloaddíciós (SPAAC) reakciót, amely egy új típusú, rézmentes klikk kémia alkalmazását teszi lehetővé. Beszámoltak arról, hogy a ciklooktin (OCT) fiziológiás körülmények között aziddal reagál réz katalízis nélkül [84], [85]. Mivel az OCT-t használó SPAAC reakció hátránya a hosszú reakcióidő, a probléma megoldására módosított OCT-eket állítottak elő. A rézmentes klikk kémia módosított OCT-k alkalmazásával gyorsabb és kisebb citotoxicitással rendelkezik. Egy másik munkában sikeresen kifejlesztettek egy inverz elektron függő Diels-Alder (iEDDA) reakciót, amely s-

tetrazin és transz-ciklooktén (TCO) származékok cikloaddícióján alapszik, és gyorsabb, rézmentes klikk kémiát eredményez, mint a SPAAC [86]. Ezeknek a módszereknek a biológiai alkalmazása felettébb előnyös lehet a biológiai kutatások, különösen a képalkotás területén.



5. ábra: Különböző klikk reakciók sémája. A: CuAAC reakció aziddal és lineáris alkinnal, B: SPAAC reakció aziddal és ciklooktinnal, C: iEDDA reakció s-tetrazin-nal és TCO-val [87].

2. Problémafelvetés

Mikroszkópos mérések során a jobb jel-zaj arány érdekében gyakran megnövelt gerjesztő intenzitást alkalmazunk, hogy fényesebb képeket kaphassunk. A fényes képek előnyei közé tartozik, hogy a háttértől jól megkülönböztethetőek a jelölt komponensek, de ennek ellenére nem mindig adnak értékelhető eredményt. A képalkotás azon általános feltételezéseken alapul, hogy a fluoreszcens jel elhelyezkedése megegyezik a jelölt molekula biológiai rendeltetésének megfelelő helyével, illetve intenzitása arányos a kísérlet során használt jelölt antitestek koncentrációjával és a mintát megvilágító fény intenzitásával. Sajnos a szaturáció jelensége miatt ezek a feltételezések gyakran nem teljesülnek.

A szaturáció forrásai különbözőek lehetnek. 1.) Biológiai szaturáció: ez a jelenség, ami fehérjék fokozott kifejeződésekor lép fel. Az extrém fehérje kifejeződésnek köszönhetően a transzfektált sejt fehérjeszintetizáló és szortírozó mechanizmusai telítődnek, ezért fehérje-aggregátumok, módosult sejtalkotók jelennek meg a mikroszkópos felvételeken, és a transzfektált fehérjék nem a fiziológiás helyzetnek megfelelő helyen találhatóak (<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu>) 2.) Detektor szaturáció: ebben az esetben a detektor feszültségét, vagy a gerjesztő fény intenzitását növeljük túlságosan. A detektálási határ fölé eső fluoreszcencia intenzitások nem megkülönböztethetőek egymástól. 3.) Fluorofór szaturáció: ilyenkor a legtöbb fluorofór gerjesztett állapotban van. A magas intenzitású gerjesztő fénynek köszönhetően a fluorofórok relaxációjukat követően azonnal újragerjesztődnek. 4.) Antitestek túljelölése: a jelölési arány növelésével a jelölésre használt antitestek több fluoreszcens molekulát tartalmaznak. Közvetett bizonyítékok arra utalnak, hogy a festék kvantumhatékonysága és az antitest affinitása csökken a jelölési arány növekedésével.

3. Célkitűzés

A problémafelvetés első két pontjában említett szaturáció forrás könnyen felismerhető, látható problémát okoz, melyek kezelése, illetve korrekciója egyszerűen lehetséges. Azonban az utóbbi két esetben ezek a problémák rejtve maradnak, mivel számításainkat azzal a feltételezéssel hajtjuk végre, hogy szaturációs jelenségek nincsenek, ezért méréseink kiértékelése során téves következtetéseket vonhatunk le. Dolgozatomban éppen ezért az antitestek túljelölésének problémájával, illetve a fluorofór szaturáció hetero-FRET-re gyakorolt negatív hatásával fogok foglalkozni.

Az antitestek fluoreszcens festékekkel történő jelölése esetében szeretnénk volna meghatározni:

- a) különböző jelölési arányú antitestek affinitását,
- b) a sejthez kötött antitestfrakció jelölési arányát,
- c) a jelölési arány hatását a festékek fluoreszcencia élettartamára,
- d) egyedi antitest molekulák fluoreszcencia intenzitás eloszlását a törzsoldatban és a kötődött antitest frakcióban.

Fluorofór szaturációs vizsgálatok során céljaink a következők voltak:

- a) a megvilágító fény intenzitása milyen módon befolyásolja a hagyományos képlettel számolt FRET értékeket.
- b) Amennyiben befolyásolja, olyan képletet szeretnénk volna meghatározni, ami a fluorofór szaturációt és FRET frusztrációt figyelembe veszi.

4. Elmélet

A fejezetben bemutatásra kerülnek a disszertációmban alkalmazott matematikai összefüggések és modellrendszerek, melyek már az irodalomból ismertek (4.1. fejezet), illetve azok is, melyek az új eredmények érdekében lettek kidolgozva (4.1.2. fejezet 25. egyenlete és 4.2. fejezet).

4.1. Fluorofór konjugációs és antitest affinitással kapcsolatos vizsgálatok

4.1.1. Antitestek jelölési arányának meghatározása spektrofotométerrel

A jelölt törzsoldatok abszorbanciáját két hullámhosszon mértük, amelyek megfelelnek a festék abszorpciós maximumának és az abszorbeáló aminosavak abszorpciójának az UV-tartományban (280 nm):

$$A(\lambda_{dye}) = A_{dye}(\lambda_{dye}) = \varepsilon_{dye} c_{dye,M} L \quad (18)$$

$$A(280) = A_{IgG}(280) + A_{dye}(280) = \varepsilon_{IgG} c_{IgG,M} L + A_{dye}(\lambda_{dye}) CF \quad (19)$$

ahol, az A az optikai denzitása az alsó indexben megjelölt molekulának a zárójelben mért hullámhosszon. ε_{IgG} az antitest moláris abszorpciós koefficiense 280 nm-en, még az ε_{dye} a festék moláris abszorpciós koefficiense a festék abszorpciós maximumán. $c_{dye,M}$ és $c_{IgG,M}$ a festék illetve az antitest moláris koncentrációja, az L a centiméterben mért optikai úthossz, és a CF egy korrekciós faktor, ami a festék 280 nm-en mért optikai denzitását viszonyítja annak abszorpciós maximumán történő abszorpciójához. A korrekciós faktorok a gyártók által elérhetőek, illetve meghatározhatóak a szabad festék abszorpciós spektrumából. Ha a festék optikai denzitása nagyobb két OD egységnél annak abszorpciós maximumán, akkor hígítani kell az antitest törzsoldatot, és számításba kell venni a hígítási faktort (DF). A 19. egyenlet átrendezésével az antitest koncentrációja megadható:

$$c_{IgG,M} = \frac{A(280) - A_{dye}(\lambda_{dye}) CF}{\varepsilon_{IgG} L} DF \quad (20)$$

A jelölt törzsoldatban lévő festékek moláris koncentrációja a következőképpen számítható ki a 18. egyenlet alapján:

$$c_{dye,M} = \frac{A(\lambda_{dye}) DF}{\varepsilon_{dye} L} \quad (21)$$

A törzsoldat átlagos jelölési aránya a két moláris koncentráció arányával adható meg:

$$DOL = \frac{c_{dye,M}}{c_{IgG,M}} \quad (22)$$

Azért, hogy az antitest koncentrációt meghatározhassuk az általánosan használt mg/ml-es koncentrációban, a moláris koncentrációt ($c_{IgG,M}$) szorozni kell az IgG mg-ban mért moláris tömegével:

$$c_{IgG,mg/ml} = c_{IgG,M} 1,5 \times 10^8 \text{ mg/mól} \quad (23)$$

4.1.2. Különböző jelölési arányú antitestek eloszlása a sejthez kötött frakcióban

Egy adott átlagos jelölési aránnyal rendelkező antitest törzsoldatban a különböző jelölési arányú antitest specieszek eloszlása egy adott antitest populációban a Poisson eloszlással közelíthető, melynek érvényességét és érvényességének korlátait a diszkusszióban részletesebben tárgyaljuk:

$$f_k = c_{tot} \frac{DOL^k}{k!} e^{-DOL} \quad (24)$$

ahol az f_k a k jelölési aránnyal rendelkező antitest specieszek koncentrációja, a DOL és a c_{tot} egy antitest törzsoldat átlagos jelölési aránya és koncentrációja. Az egyes k jelölési arányú, kötött antitest specieszek koncentrációja a következő kötődési egyenletek felírásával meghatározható, feltéve hogy nincs jelen ligand depléción, azaz $f_k = f_{k,tot}$.

$$\begin{aligned} K_{d0} f_{b_0} &= f_0 s_{unbound} \\ K_{d1} f_{b_1} &= f_1 s_{unbound} \\ K_{d2} f_{b_2} &= f_2 s_{unbound} \\ &\dots \\ K_{dn} f_{b_n} &= f_n s_{unbound} \\ f_{b_0} + f_{b_1} + f_{b_2} + \dots + f_{b_n} + s_{unbound} &= s_{tot} \end{aligned} \quad (25)$$

ahol a $K_{d0}, K_{d1}, K_{d2}, \dots$ a jelöletlen illetve 1, 2, ... jelölési aránnyal rendelkező antitest specieszek disszociációs állandója, az s_{tot} és az $s_{unbound}$ a kötőhely (epitóp) teljes koncentrációja, ill. az antitestet nem kötött epitóp koncentrációja. Az $f_0, f_1, f_2, \dots$ a jelöletlen, illetve az 1, 2, ... jelölési aránnyal rendelkező antitestek koncentrációja, míg az $fb_0, fb_1, fb_2, \dots$ a receptor kötött jelöletlen, és különböző DOL-lal rendelkező antitestek koncentrációját mutatja. A fenti egyenlet rendszer a következőképpen alakítható mátrix formává:

$$\begin{bmatrix} K_{d0} & 0 & 0 & \dots & 0 & -f_0 \\ 0 & K_{d1} & 0 & \dots & 0 & -f_1 \\ 0 & 0 & K_{d2} & \dots & 0 & -f_2 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & 0 & \dots & K_{dn} & -f_n \\ 1 & 1 & 1 & \dots & 1 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} fb_0 \\ fb_1 \\ fb_2 \\ \dots \\ fb_n \\ s_{unbound} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ \dots \\ 0 \\ s_{tot} \end{bmatrix} \quad (26)$$

Melynek a megoldása a következő:

$$\begin{bmatrix} fb_0 \\ fb_1 \\ fb_2 \\ \dots \\ fb_n \\ s_{unbound} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} K_{d0} & 0 & 0 & \dots & 0 & -f_0 \\ 0 & K_{d1} & 0 & \dots & 0 & -f_1 \\ 0 & 0 & K_{d2} & \dots & 0 & -f_2 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & 0 & \dots & K_{dn} & -f_n \\ 1 & 1 & 1 & \dots & 1 & 1 \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ \dots \\ 0 \\ s_{tot} \end{bmatrix} \quad (27)$$

Az antitest törzsoldat összes fluoreszcencia intenzitását a különböző specieszek teljes fluoreszcencia intenzitása adja:

$$F_{szabad} = \sum_{k=1}^{\text{legmagasabb DOL}} f_k k Q_k \quad (28)$$

ahol a Q_k a fluorofórok kvantumhatásfoka egy k számú fluorofórt kötött antitest esetében.

A kötött antitestfrakció teljes fluoreszcencia intenzitása ezen alapelveket alkalmazva a következőképpen határozható meg.

$$F_{kötött} = \sum_{k=1}^{\text{legmagasabb DOL}} fb_k k Q_k \quad (29)$$

A kötött antitestfrakció átlag jelölési aránya a következő egyenlet szerint számolható ki.

$$\overline{DOL}_{kötött} = \frac{\sum_{k=0}^{legmagasabb\ DOL} f b_k k}{\sum_{k=0}^{legmagasabb\ DOL} f b_k} \quad (30)$$

4.1.3. Az antitest oldatok anizotrópiájának függése az egyes antitest specieszek arányától a szabad és a kötött frakció esetében

Különböző jelölési arányú antitestek keverékének anizotrópiája a benne lévő különböző specieszek intenzitás súlyozott anizotrópiájának átlagolásával megadható.

$$r = \frac{\sum_i \phi_i r_i}{\sum_i \phi_i} \quad (31)$$

ahol az r_i és a ϕ_i az egyes specieszek anizotrópiája, és intenzitása. A fenti egyenlet antitest törzsoldatra történő átalakításakor a következőt kapjuk:

$$r_{szabad} = \frac{\sum_{k=1}^{legmagasabb\ DOL} f_k k Q_k r_k}{\sum_{k=1}^{legmagasabb\ DOL} f_k k Q_k} \quad (32)$$

ahol Q_k egy k jelölési arányú antitesten jelenlévő festékek fluoreszcens kvantumhatékonysága. A kötött antitest frakció anizotrópiája a következő egyenlettel határozható meg.

$$r_{kötött} = \frac{\sum_{k=1}^{legmagasabb\ DOL} f b_k k Q_k r_k}{\sum_{k=1}^{legmagasabb\ DOL} f b_k k Q_k} \quad (33)$$

Különböző jelölési arányú szabad (f_k) és kötött ($f b_k$) antitest viszonylagos frakcióját az előző fejezetben bemutatott egyenletek adják meg. A k számú fluoroforból álló klaszter anizotrópiája (r_k) csökken a növekvő klasztermérettel a festékek között lejátszódó homo-

FRET-nek köszönhetően. Ezt a jelenséget Runnels és Scarlata közölt cikkük 18. egyenletében figyelembe vették [88]. Feltételezve azt, hogy a homo-FRET által gerjesztett fluorofór anizotrópiája nulla, a jelenséget a következő formula írja le:

$$r_k = r_1 \frac{1 + \left(\frac{R_0}{R}\right)^6}{1 + k \left(\frac{R_0}{R}\right)^6} = r_1 \frac{1 + \tau E}{1 + n \tau E} \quad (34)$$

ahol az r_1 és a τ a fluorofór anizotrópiája, illetve fluoreszcencia élettartama FRET hiányában, az R a két fluorofór közötti távolság, az E a homo-FRET hatékonyság, és az R_0 a homo-FRET-tel kölcsönható festék Förster távolsága. A Perrin egyenletet alkalmazva az r_1 a határanizotrópia (r_0) függvényében kifejezhető, és ez felhasználható egy klaszter anizotrópiának meghatározásához.

$$r_1 = r_0 \frac{\theta}{\theta + \tau} \Rightarrow r_k = r_0 \frac{\theta}{\theta + \tau} \frac{1 + \left(\frac{R_0}{R}\right)^6}{1 + k \left(\frac{R_0}{R}\right)^6} = r_0 \frac{\theta}{\theta + \tau} \frac{1 + \tau E}{1 + k \tau E} \quad (35)$$

ahol a θ a rotációs korrelációs idő.

4.2. Fluorofór szaturációs vizsgálatok

4.2.1. A donor szaturáció hatása a látszólagos FRET hatékonyságra

Először vizsgáljuk meg a fluorofór szaturáció jelenségét FRET hiányában. Egy pillanatra feltételezzük, hogy egy fluorofórnak csak alap, illetve gerjesztett szingulett állapota van. Egyensúlyban az alapállapotból gerjesztődő fluorofórok száma megegyezik az éppen relaxálódó gerjesztett fluorofórok számával. Ezt az állapotot a következő mátrix egyenlet foglalja össze:

$$\begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ D_{all} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -\Phi_D \sigma_D & \frac{1}{\tau_D} \\ \Phi_D \sigma_D & -\frac{1}{\tau_D} \\ 1 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} D \\ D^* \end{pmatrix} \quad (36)$$

ahol a Φ_D a donor-gerjesztő lézer foton-fluxusa, σ_D és τ_D a donor abszorpciós keresztmetszete illetve fluoreszcencia élettartama. A D és D^* az alap és gerjesztett állapotban lévő donorok koncentrációja, míg a D_{all} jelöli a donorok teljes koncentrációját. A mátrix egyenlet megoldását D és D^* -ra a következő egyenletek mutatják.

$$D = \frac{D_{all}}{1 + \sigma_D \tau_D \Phi_D}, D^* = \frac{D_{all} \sigma_D \tau_D \Phi_D}{1 + \sigma_D \tau_D \Phi_D} \quad (37)$$

A fluorofór szaturáció az a jelenség, amikor a gerjesztett fluorofórok fluoreszcencia intenzitása nem egyenesen arányos a megvilágító fény intenzitásával. Ilyenkor a legtöbb fluorofór gerjesztett állapotban van. A fluorofór szaturációt, azaz a gerjesztett állapotban levő fluorofórok arányát (D_{sat}) a következő egyenlet segítségével lehet meghatározni:

$$D_{sat} = \frac{\sigma_D \tau_D \Phi_D}{1 + \sigma_D \tau_D \Phi_D} \Rightarrow D^* = D_{all} D_{sat} \quad (38)$$

A FRET legegyszerűbb és legközvetlenebb következménye a donor kioltása, pl.: akceptor jelenlétében csökken a fluoreszcencia intenzitása. Vizsgáljuk meg a donor kioltásának mértékét abban az esetben, ha a szaturáció jelensége nem elhanyagolható. Az egyetlen donorra alkalmazott elvet használva az egyensúlyi állapotot a következő mátrix egyenlet írja le:

$$\begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ D_{all} \\ A_{all} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -\Phi_D \sigma_D & \frac{1}{(1-E)\tau_D} & 0 & 0 \\ \Phi_D \sigma_D & -\frac{1}{(1-E)\tau_D} & 0 & 0 \\ 0 & -\frac{E}{(1-E)\tau_D} & -\Phi_D \sigma_A & \frac{1}{\tau_A} \\ 0 & \frac{E}{(1-E)\tau_D} & \Phi_D \sigma_A & -\frac{1}{\tau_A} \\ 1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} D \\ D^* \\ A \\ A^* \end{pmatrix} \quad (39)$$

ahol E a FRET hatékonyság, σ_A és τ_A az akceptor abszorpciós keresztmetszete illetve fluoreszcencia élettartama. Az A és A^* az alap, illetve gerjesztett állapotú akceptor koncentrációja, míg az A_{all} jelöli az akceptor teljes koncentrációját. A fenti egyenlet megoldásaként a D^* és A^* a következőképpen adható meg:

$$D^* = \frac{D_{all} (1-E) \sigma_D \tau_D \Phi_D}{1 + (1-E) \sigma_D \tau_D \Phi_D}$$

$$A^* = \frac{\tau_A \Phi_D \left(A_{all} \sigma_A + \frac{D_{all} E \sigma_D}{1 + (1-E) \sigma_D \tau_D \Phi_D} \right)}{1 + \sigma_A \tau_A \Phi_D} \quad (40)$$

Ezek a képletek egyszerűsíthetők a 38. egyenletben definiált donor szaturáció segítségével:

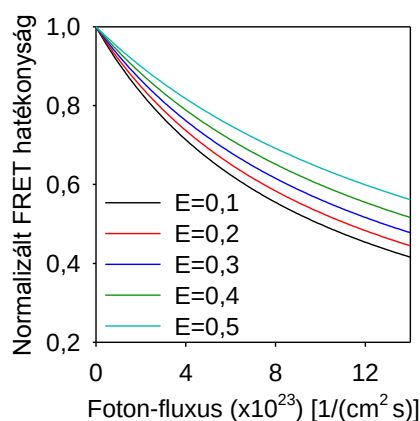
$$D^* = \frac{D_{all} D_{sat} (1-E)}{1 - D_{sat} E}$$

$$A^* = A_{All} A_{sat} + \frac{(1 - A_{sat}) D_{all} D_{sat} E \tau_A}{(1 - D_{sat} E) \tau_D} \quad (41)$$

Mivel a donor fluoreszcencia intenzitása arányos a gerjesztett állapotban lévő donorok intenzitásával, ezért a donor kioltásból számolt látszólagos FRET hatékonyság a következőképpen határozható meg.

$$E_{l\acute{a}tsz\acute{o}lagos} = 1 - \frac{D_A^*}{D_{no A}^*} = \frac{E}{1 + (1-E) \sigma_D \tau_D \Phi_D} = \frac{(1 - D_{sat}) E}{1 - D_{sat} E} \quad (42)$$

ahol a D_A^* és a $D_{no A}^*$ a gerjesztett donorok koncentrációja akceptor jelenlétében és hiányában, E az az elméleti FRET érték, ami akkor figyelhető meg, amikor a foton-fluxus megközelíti a nullát (ebben az esetben a donor szaturáció elhanyagolható). Ez az egyenlet megjósolja a látszólagos FRET hanyatlását a donor szaturáció függvényében, melyet befolyásol az elméleti FRET hatékonyság (6. ábra).



6. ábra: Hagyományos képlettel számolt FRET hatékonyság a foton-fluxus függvényében különböző elméleti FRET értékek esetén. A donorra jellemző fluoreszcencia élettartam 4,1ns, moláris abszorpciós koefficiens $73000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, ami megfelel az AlexaFluor488-as festéknek. Feltételeztük, hogy a fluorofór energiatranszferben vesz részt, melynek hatásfoka 0,1-0,5 között van. A látszólagos FRET hatékonyságot a 42. egyenlet alapján határoztuk meg triplet állapotot nem feltételezve. A számolt eredményeinket a végtelenül kicsi gerjesztési teljesítmény mellett mérhető elméleti FRET értékekre normalizáltuk.

Az 42. egyenlet egyértelmű lehetőséget nyújt a számolt, látszólagos FRET hatékonyság donor szaturációra történő korrekciójára:

$$E = \frac{E_{\text{látszólagos}}}{1 + D_{\text{sat}} (E_{\text{látszólagos}} - 1)} \quad (43)$$

4.2.2. A triplet állapot hatása a donor szaturációtól függő látszólagos FRET hatékonyságra

A legtöbb fluorofór tiltott átmeneten keresztül képes gerjesztett szingulett állapotból triplet állapotba jutni, ami jelentősen befolyásolja a fluorofór szaturáció jelenségét. A következő mátrix egyenlet egyensúlyban írja le a donor S0, S1 és T1 állapotainak populációsűrűségét FRET jelenléte nélkül.

$$\begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ D_{all} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -\Phi_D \sigma_D & \frac{1}{\tau_D} - k_{isc} & k_{ph} \\ \Phi_D \sigma_D & -\frac{1}{\tau_D} & 0 \\ 0 & k_{isc} & -k_{ph} \\ 1 & 1 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} S_0 \\ S_1 \\ T_1 \end{pmatrix} \quad (44)$$

ahol a k_{isc} a tiltott átmenet sebességi állandója. Anélkül, hogy elvesztenénk a modellünk általános érvényességét, azt feltételezzük, hogy a T1 állapotban lévő fluorofórok csak foszforeszcenciával relaxálódnak, és így kerülnek S0 állapotba. Így a k_{ph} jelöli a triplet állapotból történő relaxációk összesített sebességi állandóját. A fenti egyenlet megoldása a következő:

$$\begin{aligned} S_0 &= \frac{D_{all} k_{ph}}{k_{ph} + (k_{isc} + k_{ph}) \sigma_D \tau_D \Phi_D} \\ S_1 &= \frac{D_{all} k_{ph} \sigma_D \tau_D \Phi_D}{k_{ph} + (k_{isc} + k_{ph}) \sigma_D \tau_D \Phi_D} \\ T_1 &= \frac{D_{all} k_{isc} \sigma_D \tau_D \Phi_D}{k_{ph} + (k_{isc} + k_{ph}) \sigma_D \tau_D \Phi_D} \end{aligned} \quad (45)$$

A donor által kibocsátott maximális fluoreszcencia intenzitást végtelenül nagy foton-fluxus esetén a következő egyenlet adja meg.

$$\lim_{\Phi_D \rightarrow \infty} \left(\frac{D_{all} k_{ph} \sigma_D \tau_D \Phi_D}{k_{ph} + (k_{isc} + k_{ph}) \sigma_D \tau_D \Phi_D} \right) = \frac{k_{ph} D_{all}}{k_{isc} + k_{ph}} \quad (46)$$

Hasonlóan a 38. egyenlethez, a szaturálódott donorok hányada triplet állapot fennállása esetében meghatározható az alábbi képlettel:

$$D_{sat,T} = \frac{\frac{D_{all} k_{ph} \sigma_D \tau_D \Phi_D}{k_{ph} + (k_{isc} + k_{ph}) \sigma_D \tau_D \Phi_D}}{\frac{k_{ph} D_{all}}{k_{isc} + k_{ph}}} = \frac{(k_{isc} + k_{ph}) \sigma_D \tau_D \Phi_D}{k_{ph} + (k_{isc} + k_{ph}) \sigma_D \tau_D \Phi_D} \quad (47)$$

Az előző egyenlet tovább egyszerűsíthető a D_{sat} kifejezés használatával:

$$D_{sat,T} = \frac{D_{sat} (k_{isc} + k_{ph})}{D_{sat} k_{isc} + k_{ph}} \quad (48)$$

FRET lejátszódása esetén a donor S0, S1 és T1 állapotainak populációsűrűségét egyensúlyi állapotban a következőképpen fejezhetjük ki.

$$\begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ D_{all} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -\Phi_D \sigma_D & \frac{1 + (E-1)k_{isc} \tau_D}{(1-E) \tau_D} & k_{ph} \\ \Phi_D \sigma_D & -\frac{1}{(1-E) \tau_D} & 0 \\ 0 & k_{isc} & -k_{ph} \\ 1 & 1 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} S_0 \\ S_1 \\ T_1 \end{pmatrix} \quad (49)$$

Az S1→S0 átmenet időállandója a következők alapján meghatározható:

$$\left. \begin{aligned} \tau_{DA} &= \frac{1}{k_f + k_{nf} + k_{isc} + k_{fret}} \\ \tau_D &= \frac{1}{k_f + k_{nf} + k_{isc}} \\ E &= 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \\ \tau_{S1 \rightarrow S0} &= \frac{1}{k_f + k_{nf} + k_{fret}} \end{aligned} \right\} \tau_{S1 \rightarrow S0} = \frac{\tau_D (1-E)}{1 + (E-1)k_{isc} \tau_D} \quad (50)$$

Az 49. számú egyenlet S0, S1 és T1-re történő megoldása az alábbiakban látható:

$$\begin{aligned} S_0 &= \frac{k_{ph} D_{all}}{(E-1)(k_{isc} + k_{ph}) \sigma_D \tau_D \Phi_D - k_{ph}} \\ S_1 &= \frac{(E-1)k_{ph} D_{all} \sigma_D \tau_D \Phi_D}{(E-1)(k_{isc} + k_{ph}) \sigma_D \tau_D \Phi_D - k_{ph}} \\ T_1 &= \frac{(E-1)k_{isc} D_{all} \sigma_D \tau_D \Phi_D}{(E-1)(k_{isc} + k_{ph}) \sigma_D \tau_D \Phi_D - k_{ph}} \end{aligned} \quad (51)$$

A 42. egyenlethez hasonlóan fejezzük ki a triplet állapot figyelembe vételével a donor kioltás alapján számolt látszólagos FRET hatásfokot:

$$E_{\text{látszólagos}} = 1 - \frac{S_{1,A}}{S_{1,no A}} = \frac{E k_{ph}}{(E-1)(k_{isc} + k_{ph})\sigma_D \tau_D \Phi_D - k_{ph}} \quad (52)$$

ahol az $S_{1,A}$ és az $S_{1, no A}$ az S1 állapot egyensúlyi koncentrációja akceptor jelenlétében (51. egyenlet), illetve annak jelenléte nélkül (45. egyenlet). A donor szaturáció mértékét meghatározó 47. egyenletet alkalmazva az előző formula jelentősen egyszerűsíthető:

$$E_{\text{látszólagos}} = \frac{(1 - D_{sat,T})E}{1 - D_{sat,T} E} \quad (53)$$

Annak ellenére, hogy az S1 állapot szaturációjának mértékét nagymértékben befolyásolja a triplet állapot, az 42. és 53. egyenletek összehasonlításával jól látható, hogy a látszólagos FRET hatékonyság csak az S1 állapot szaturációjának mértékétől függ függetlenül attól, hogy a triplet állapot jelen van-e.

4.2.3. A fluorofór szaturáció és a látszólagos foton-fluxus meghatározása

Mivel mobilis fluorofórok vizsgálata esetében a fotoelhalványítás elhanyagolható, így a fluorofór szaturáció mérése ezen fluorofórok fluoreszcencia intenzitás mérésével lehetséges a gerjesztő foton-fluxus függvényében. Méréseink során úgy találtuk, hogy a foton-fluxus lineárisan változik a mikroszkópon változtatható százalékos lézerintenzitással (1. Eredmények fejezet, 18. ábra), így a fluoreszcencia intenzitásokat normalizáltuk arra az intenzitás (I_1) értékre, amit a legkisebb lézerteljesítmény mellett mértünk, és a következő egyenlet segítségével határoztuk meg:

$$\left. \begin{aligned} I_1 &\sim \frac{\sigma \tau \Phi_1}{1 + \sigma \tau \Phi_1} \\ I_k &\sim \frac{\sigma \tau k \Phi_1}{1 + \sigma \tau k \Phi_1} \end{aligned} \right\} I_{k,norm} = 1 + \frac{k-1}{1 + k \sigma \tau \Phi_1} \quad (54)$$

ahol k jelöli, hogy I_k mérése esetében a lézerintenzitás hányszor volt nagyobb a legalacsonyabb gerjesztési intenzitáshoz képest, a Φ_1 mutatja az I_1 méréséhez használt foton-fluxust. Hogyha az 54. egyenletet a normalizált, mért intenzitásokra illesztjük, akkor ezzel a

Φ_1 meghatározható. Φ_1 viszonylag könnyen meghatározható a lézerteljesítmény mérésével, az egyes fotonok energiájának és a pontkiterjedési függvény figyelembevételével. A pontkiterjedési függvény egy pontszerű objektumnak a leképező rendszer által létrehozott képe. A következő okok miatt mégis úgy döntöttünk, hogy az illesztett értékeket használjuk a Φ_1 meghatározására a következő okok miatt: (i) egy objektív pontkiterjedési függvénye gyakran ismeretlen; (ii) korrigálni szerettünk volna a triplet állapottal, mely befolyásolja az S1 állapotban lévő szaturálódott molekulák hányadát az alábbiak szerint.

A foton-fluxus egy változó a következő részben bemutatott egyenletekben, melyeket az intenzitás alapú FRET hatékonyság kísérleti meghatározásához használunk. Az egyenletek levezetéséhez használt modell nem tartalmazza a triplet állapotot, mivel az $S1 \rightarrow T1$ és $T1 \rightarrow S0$ átmenet sebességi állandója jellemzően nem ismert, és egy olyan módszert szerettünk volna alkotni, ami ezen állandók meghatározása nélkül is alkalmazható. Az 54. egyenlet a foton-fluxus meghatározására szintén mellőzi a triplet állapotot. Mivel ez az egyenlet a fluoreszcencia szaturálódott hányada alapján becslést ad a foton-fluxusról, ez egy torzított becslést eredményez, mivel a szaturált állapotban lévő fluorofórokra hatással van a triplet állapot. Ezen hiba mértéke kiszámolható azáltal, hogy figyelembe vesszük, hogy olyan modellt alkalmaztunk, ami a triplet állapotot mellőzi (a 38. egyenlet szerint) egy olyan fluorofór esetében, ami triplet állapotba kerülhet (l. 47. egyenlet).

$$\frac{(k_{isc} + k_{ph}) \sigma \tau \Phi_{valós}}{k_{ph} + (k_{isc} + k_{ph}) \sigma \tau \Phi_{valós}} = \frac{\sigma \tau \Phi_{látszólagos}}{1 + \sigma \tau \Phi_{látszólagos}} \Rightarrow \Phi_{látszólagos} = \frac{k_{isc} + k_{ph}}{k_{ph}} \Phi_{valós} \quad (55)$$

ahol $\Phi_{valós}$ a valós foton-fluxus és $\Phi_{látszólagos}$ a triplet állapotot figyelmen kívül hagyó modell alapján becsült foton-fluxus. Helyettesítsük be ezt a torzítottan becsült foton-fluxust abba az egyenletbe, ahol a látszólagos FRET hatásfokot határoztuk meg egy szintén triplet állapotot mellőző módszerrel (42. egyenlet szerint):

$$\left. \begin{aligned} E_{látszólagos} &= \frac{E}{1 + (1 - E) \sigma_D \tau_D \Phi_{látszólagos}} \\ \Phi_{látszólagos} &= \frac{k_{isc} + k_{ph}}{k_{ph}} \Phi_{valós} \end{aligned} \right\} E_{látszólagos} = \frac{E k_{ph}}{(E - 1)(k_{isc} + k_{ph}) \sigma_D \tau_D \Phi_{real} - k_{ph}} \quad (56)$$

A FRET hatékonyságra a fenti egyenlet által adott megoldás megegyezik azzal az egyenlettel, ahol a triplet állapotot számításba vettük (52. egyenlet). Mindez azt mutatja, hogy a triplet állapot mellőzése miatt torzítottan becsült foton-fluxus helyes FRET hatékonysághoz vezet egy olyan rendszerben, ahol valóban vannak triplet állapotú fluorofórok. Ezért ezt a becslést,

látszólagos foton-fluxust alkalmazzuk az intenzitás alapú FRET számítások során a következő fejezetekben.

4.2.4. Átvilágítási faktorok és az α paraméter a szaturáció tekintetében

A fentiekben tárgyalt intenzitás alapú egyenletek megoldása előtt meg kell vizsgálni a fluorofór szaturáció átvilágítási faktorokra és α paraméterre gyakorolt hatását. Az α értéke kifejezi a donor csatornában mért gerjesztett donorok detektálási hatékonyságának arányát a FRET csatornában mért gerjesztett akceptor detektálási hatékonyságához képest:

$$\alpha = \frac{Q_A \eta_{A,2}}{Q_D \eta_{D,1}} \quad (57)$$

ahol a Q_D és a Q_A a donor, illetve akceptor fluoreszcencia kvantumhatásfoka, még a $\eta_{D,1}$ a donor fotonok detektálási hatékonysága az első (donor) csatornában és $\eta_{A,2}$ az akceptor detektálási hatékonysága a második (FRET) csatornában. Az α meghatározására szolgáló kísérleti módszerek egyikének megfelelően [89] a mintát egy adott epitóp elleni, donor-konjugált antitesttel jelöltük. Ezen minta fluoreszcencia intenzitása M_D . Egy másik mintában ugyanilyen sejteket ugyanezen antitest akceptor-konjugált változatával jelöltük. Az utóbbi minta intenzitását az M_A értéke mutatja. Az M_D -t és M_A -t leíró képletekből az α értéke meghatározható:

$$\left. \begin{aligned} M_D &\sim L_D \sigma_{D(D)} \Phi_D Q_D \eta_{D,1} \\ M_A &\sim L_A \sigma_{A(D)} \Phi_D Q_A \eta_{A,2} \end{aligned} \right\} \alpha = \frac{M_A L_D \sigma_{D(D)}}{M_D L_A \sigma_{A(D)}} \quad (58)$$

ahol az L_D és L_A a donorral, illetve akceptorral jelölt antitestek fluoreszcencia intenzitása, $\sigma_{D(D)}$ a donor abszorpciós keresztmetszete a donor gerjesztési hullámhosszán, $\sigma_{A(D)}$ az akceptor abszorpciós keresztmetszete a donor gerjesztési hullámhosszán. Az 58. egyenlet nem veszi figyelembe a donor szaturációt. Ha ezt a jelenséget is figyelembe szeretnénk venni, akkor az α meghatározása a következőképpen alakul.

$$\left. \begin{aligned} M_D &\sim L_D D_{sat,D} k_{f,D} \eta_{D,1} \\ M_A &\sim L_A A_{sat,D} k_{f,A} \eta_{A,2} \end{aligned} \right\} \alpha_{sat} = \frac{M_A L_D D_{sat,D} \tau_A}{M_D L_A A_{sat,D} \tau_D} \quad (59)$$

ahol a $D_{sat,D}$ és $A_{sat,D}$ a donor, ill. az akceptor szaturációjának mértéke a donor gerjesztési hullámhosszán. A τ_D és τ_A a donor és akceptor fluoreszcencia élettartama, míg a $k_{f,D}$ és a $k_{f,A}$ a

donor, illetve akceptor fluoreszcencia sebességi állandója. Annak érdekében, hogy megmutassuk az 59. egyenlet mögötti feltételezésünk érvényességét, meghatároztuk az α határértékét végtelenül alacsony lézerintenzitás mellett.

$$\lim_{\Phi_D \rightarrow 0} \frac{M_A L_D D_{sat,D} \tau_A}{M_D L_A A_{sat,D} \tau_D} = \lim_{\Phi_D \rightarrow 0} \frac{M_A L_D \frac{\sigma_{D(D)} \tau_D \Phi_D}{1 + \sigma_{D(D)} \tau_D \Phi_D} \tau_A}{M_D L_A \frac{\sigma_{A(D)} \tau_A \Phi_D}{1 + \sigma_{A(D)} \tau_A \Phi_D} \tau_D} = \frac{M_A L_D \sigma_{D(D)}}{M_D L_A \sigma_{A(D)}} \quad (60)$$

Mivel az $\alpha_{sat} \Phi \rightarrow 0$ esetben számolt határértéke azonos az 58. egyenlettel (amit egy korábbi publikációban [89] már leírtak), így az 60. egyenletben foglalt feltételezések helyesek. Ha figyelembe vesszük a szaturáció mértékét, akkor a hagyományos módszer alapján megjósolható az α torzulásának mértéke a fluorofór szaturáció függvényében a következő képlet szerint:

$$\alpha_{l\acute{a}tsz\acute{o}lagos} = \alpha \frac{A_{sat,D} \sigma_{D(D)} \tau_D}{D_{sat,D} \sigma_{A(D)} \tau_A} \quad (61)$$

Az intenzitás alapú FRET méréseket leíró egyenletekben jelenlevő átvilágítási faktorokat az 1. táblázat foglalja össze.

Paraméter	Jele	Kísérleti érték		Elméleti egyenletek	
		szaturáció nélkül	szaturációval	szaturáció nélkül	szaturációval
Donor átvilágítása a FRET csatornába	S_1	$\frac{I_{D,2}}{I_{D,1}}$		$\frac{\eta_{D,2}}{\eta_{D,1}}$	
Donor átvilágítása az akceptor csatornába	S_3	$\frac{I_{D,3}}{I_{D,1}}$		$\frac{\Phi_A \sigma_{D(A)} \eta_{D,3}}{\Phi_D \sigma_{D(D)} \eta_{D,1}}$	$\frac{D_{sat, A} \eta_{D,3}}{D_{sat, D} \eta_{D,1}}$
Akceptor átvilágítása a FRET csatornába	S_2	$\frac{I_{A,2}}{I_{A,3}}$		$\frac{\Phi_D \sigma_{A(D)} \eta_{A,2}}{\Phi_A \sigma_{A(A)} \eta_{A,3}}$	$\frac{A_{sat, D} \eta_{A,2}}{A_{sat, A} \eta_{A,3}}$
Akceptor átvilágítása a donor csatornába	S_4	$\frac{I_{A,1}}{I_{A,3}}$		$\frac{\Phi_D \sigma_{A(D)} \eta_{A,1}}{\Phi_A \sigma_{A(A)} \eta_{A,3}}$	$\frac{A_{sat, D} \eta_{A,1}}{A_{sat, A} \eta_{A,3}}$

1. táblázat: Az intenzitás alapú FRET hatékonyság meghatározásához szükséges átvilágítási faktorok. $I_{D,1}$, $I_{D,2}$, $I_{D,3}$ a csak donorral jelölt minta intenzitása a donor, FRET és akceptor csatornában. Az $I_{A,1}$, $I_{A,2}$, $I_{A,3}$ a csak akceptorral jelölt minta intenzitása a donor, FRET, illetve akceptor csatornában. Φ_D és Φ_A jelöli a foton-fluxust a donort gerjesztő, illetve az akceptort gerjesztő lézer esetében. A $\eta_{D,x}$ és a $\eta_{A,x}$ mutatja a donor, illetve akceptor fotonok detektálási hatékonyságát az x-edik fluoreszcens csatornában. A $D_{sat,D}$ és $D_{sat,A}$ a donor szaturációja a donor és az akceptor gerjesztési hullámhosszán. Az $A_{sat,D}$ and $A_{sat,A}$ ugyanezek a paraméterek az akceptor vonatkozásában. A $\sigma_{D(D)}$ és $\sigma_{D(A)}$ a donor abszorpciós keresztmetszete a donor, illetve az akceptor gerjesztési hullámhosszán, még $\sigma_{A(D)}$ és $\sigma_{A(A)}$ ugyanezen értékek az akceptorra vonatkozóan.

4.2.5. Donor szaturációt figyelembe vevő FRET hatékonyság meghatározása intenzitás alapú kísérletek során

Az intenzitás alapú FRET mérések során három, I_1 - I_3 -mal jelölt intenzitást mérünk. Az I_1 donor csatornában a fluorofórokat a donor gerjesztési hullámhosszán gerjesztjük és a donor emissziós tartományában detektáljuk, még az I_3 akceptor csatornában az akceptor gerjesztési hullámhosszát alkalmazzuk és annak emissziós tartományát rögzítjük. A FRET csatornában, melyet I_2 -vel jelölünk, a donor gerjesztési hullámhosszát kombináljuk az akceptor emissziós hullámhossz tartományával. A D^* és A^* (41. egyenlet) megoldásait, az 1. táblázatban szereplő átvilágítási együtthatókat és α paramétert használva az I_1 - I_3 intenzitások a következő egyenletrendszerrel leírhatóak:

$$\begin{aligned} I_1 &= \frac{F_D D_{sat,D} (1-E)}{1-D_{sat,D} E} + F_A A_{sat,A} S_4 + \frac{(1-A_{sat,D}) F_D D_{sat,D} E \alpha_{sat} S_4}{(1-D_{sat,D} E) S_2} \\ I_2 &= \frac{F_D D_{sat,D} (1-E)}{1-D_{sat,D} E} S_1 + F_A A_{sat,A} S_2 + \frac{(1-A_{sat,D}) F_D D_{sat,D} E \alpha_{sat}}{(1-D_{sat,D} E)} \\ I_3 &= \frac{F_D D_{sat,D} (1-E)}{1-D_{sat,A} E} S_3 + F_A A_{sat,A} + \frac{A_{sat,D} (1-A_{sat,A}) F_D D_{sat,A} E \alpha_{sat}}{A_{sat,A} (1-D_{sat,A} E)} \frac{1}{S_2} \end{aligned} \quad (62)$$

ahol,

$$\begin{aligned} F_D &= D_{all} k_{f,D} \eta_{D,1} \\ F_A &= A_{All} k_{f,A} \eta_{A,3} \end{aligned} \quad (63)$$

A kioltatlan donor (I_D) és a közvetlenül gerjesztett akceptor intenzitások (I_A) a következő módon viszonyulnak az F_D -hez és F_A -hoz.

$$\begin{aligned} I_D &= F_D D_{sat,D} \\ I_A &= F_A A_{sat,A} \end{aligned} \quad (64)$$

Az egyenletrendszert E -re megoldva másodfokú egyenletet kapunk, aminek megoldása túl hosszú, hogy ezen dolgozatban részletesen bemutassuk, de a disszertáció alapjául szolgáló egyik közlemény kiegészítő információ részében [90], ill. a disszertáció mellékletében megtalálható (fretWithSat_1.m Matlab fájl).

Ha ismerjük a donor és akceptor arányát és ez minden pixelre állandó (pl.: FRET mérés fúziós konstruktok között), akkor a 62. egyenletrendszer kiegészíthető egy negyedik egyenlettel, mely lehetővé teszi az α és a FRET hatékonyság egyidejű meghatározását [24]:

$$\alpha_{sat} = \frac{I_A S_2 R_{exp} D_{sat,D} \tau_A}{I_D A_{sat,D} \tau_D} \quad (65)$$

ahol az R_{exp} a donorok számának aránya az akceptorokéhoz képest. A másodfokú egyenletrendszer megoldását a mellékletben található a `fretWithSat_2.m` file tartalmazza.

4.2.6. Donor szaturációt és FRET frusztrációt számításba vevő FRET hatékonyság meghatározás intenzitás alapú kísérletek során

Egy gerjesztett akceptor nem tud akceptorként szolgálni egy gerjesztett donor számára. Ezt a jelenséget általában FRET frusztrációnak nevezzük, melyet figyelembe vettünk egy olyan rendszer esetén, mely egy donort, illetve egy akceptort tartalmaz. A rendszerben lévő négy különböző molekulapár (DA - alapállapotú donor és akceptor; D*A – gerjesztett donor és alapállapotú akceptor; DA* - alapállapotú donor és gerjesztett állapotú akceptor; D*A* - gerjesztett donor és akceptor) egyensúlyi koncentrációja a következő mátrixegyenlettel írható fel:

$$\begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ DA_{all} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -\Phi(\sigma_D + \sigma_A) & \frac{1}{\tau_D} & \frac{1}{\tau_A} & 0 \\ \Phi \sigma_D & -\frac{1}{(1-E)\tau_D} - \Phi \sigma_A & 0 & \frac{1}{\tau_A} \\ \Phi \sigma_A & \frac{E}{(1-E)\tau_D} & -\frac{1}{\tau_A} - \Phi \sigma_D & \frac{1}{\tau_D} \\ 0 & \Phi \sigma_A & \Phi \sigma_D & -\left(\frac{1}{\tau_D} + \frac{1}{\tau_A}\right) \\ 1 & 1 & 1 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} DA \\ D^*A \\ DA^* \\ D^*A^* \end{pmatrix} \quad (66)$$

melynek megoldása az alábbiakban látható:

$$\begin{aligned}
DA &= \frac{DA_{\text{all}}(-\tau_D + \tau_A(-I + (E-I)(\sigma_A + \sigma_D)\tau_D\Phi))}{\tau_D(-I + (E-I)\sigma_D\tau_D\Phi) + \tau_A^2\Phi(I + \sigma_D\tau_D\Phi)(-\sigma_A - E\sigma_D + (E-I)\sigma_A(\sigma_A + \sigma_D)\tau_D\Phi) + \tau_A(-I + \tau_D\Phi((E-2)(\sigma_A + \sigma_D) + (E-I)\sigma_D(2\sigma_A + \sigma_D)\tau_D\Phi))} \\
D^*A &= \frac{DA_{\text{all}}(E-I)\sigma_D\tau_D\Phi(\tau_A + \tau_D + (\sigma_A + \sigma_D)\tau_A\tau_D\Phi)}{\tau_D(-I + (E-I)\sigma_D\tau_D\Phi) + \tau_A^2\Phi(I + \sigma_D\tau_D\Phi)(-\sigma_A - E\sigma_D + (E-I)\sigma_A(\sigma_A + \sigma_D)\tau_D\Phi) + \tau_A(-I + \tau_D\Phi((E-2)(\sigma_A + \sigma_D) + (E-I)\sigma_D(2\sigma_A + \sigma_D)\tau_D\Phi))} \\
DA^* &= \frac{DA_{\text{all}}\tau_A\Phi(-(\sigma_A + E\sigma_D)(\tau_A + \tau_D) + (E-I)\sigma_A(\sigma_A + \sigma_D)\tau_A\tau_D\Phi)}{\tau_D(-I + (E-I)\sigma_D\tau_D\Phi) + \tau_A^2\Phi(I + \sigma_D\tau_D\Phi)(-\sigma_A - E\sigma_D + (E-I)\sigma_A(\sigma_A + \sigma_D)\tau_D\Phi) + \tau_A(-I + \tau_D\Phi((E-2)(\sigma_A + \sigma_D) + (E-I)\sigma_D(2\sigma_A + \sigma_D)\tau_D\Phi))} \\
D^*A^* &= \frac{DA_{\text{all}}\sigma_D\tau_A\tau_D\Phi^2(-\sigma_A\tau_A - E\sigma_D\tau_A - \sigma_A\tau_D + E\sigma_A\tau_D + (E-I)\sigma_A(\sigma_A + \sigma_D)\tau_A\tau_D\Phi)}{\tau_D(-I + (E-I)\sigma_D\tau_D\Phi) + \tau_A^2\Phi(I + \sigma_D\tau_D\Phi)(-\sigma_A - E\sigma_D + (E-I)\sigma_A(\sigma_A + \sigma_D)\tau_D\Phi) + \tau_A(-I + \tau_D\Phi((E-2)(\sigma_A + \sigma_D) + (E-I)\sigma_D(2\sigma_A + \sigma_D)\tau_D\Phi))}
\end{aligned}
\tag{67}$$

Azért, hogy ez a modell ne csak 1:1 arányban jelen lévő donorra és akceptorra legyen használható, szabad akceptorokat (A_f) feltételeztünk a rendszerben. Az 62. egyenletben használt módszerhez hasonló megközelítést alkalmazva a donor és akceptor intenzitások az I_1 - I_3 csatornában a következőképpen alakulnak:

$$\begin{aligned}
I_{D,1} &= D^*A^*k_{f,D}\eta_{D,1} + D^*Ak_{f,D}\eta_{D,1} \\
I_{A,1} &= (D^*A^* + DA^*)k_{f,A}\eta_{A,1} + A_f\frac{\sigma_{A(D)}\tau_A\Phi_D}{1 + \sigma_{A(D)}\tau_A\Phi_D}k_{f,A}\eta_{A,1} \\
I_{D,2} &= D^*A^*k_{f,D}\eta_{D,2} + D^*Ak_{f,D}\eta_{D,2} \\
I_{A,2} &= (D^*A^* + DA^*)k_{f,A}\eta_{A,2} + A_f\frac{\sigma_{A(D)}\tau_A\Phi_D}{1 + \sigma_{A(D)}\tau_A\Phi_D}k_{f,A}\eta_{A,2} \\
I_{D,3} &= D^*A^*k_{f,D}\eta_{D,3} + D^*Ak_{f,D}\eta_{D,3} \\
I_{A,3} &= (D^*A^* + DA^*)k_{f,A}\eta_{A,3} + A_f\frac{\sigma_A\tau_A\Phi_A}{1 + \sigma_A\tau_A\Phi_A}k_{f,A}\eta_{A,3} \\
I_D &= DA_{\text{all}}k_{f,D}\eta_{D,1} \\
I_A &= (DA_{\text{all}} + A_f)k_{f,A}\eta_{A,3}
\end{aligned}
\tag{68}$$

ahol $I_{D,X}$ és $I_{A,X}$ a donor, illetve akceptor X fluoreszcens csatornában ($X=1,2,3$ annak megfelelően, hogy donor, FRET vagy akceptor csatornáról van szó) mért fluoreszcencia intenzitása. A $k_{f,D}$ és $k_{f,A}$ a donor és akceptor fluoreszcencia sebességi állandója, míg a $\eta_{D,X}$ és $\eta_{A,X}$ a donor, illetve akceptor fotonok detektálási hatékonysága az X. fluoreszcens csatornában. D^*A^* , D^*A és DA^* egyensúlyi koncentrációját a 67. egyenlet adja meg, melyek felhasználásával $I_{D,X}$ és $I_{A,X}$ kiszámítható. A megoldások túl hosszúak ahhoz, hogy itt bemutatásra kerüljenek. Ezeket az analitikai megoldásokat felhasználva egyenletrendszer írtunk fel a mért I_1 - I_3 intenzitásokra:

$$\begin{aligned}
I_1 &= I_{D,1} + I_{A,1} \\
I_2 &= I_{D,2} + I_{A,2} \\
I_3 &= I_{D,3} + I_{A,3}
\end{aligned}
\tag{69}$$

Mivel a fenti három ismeretlenes egyenletrendszer analitikusan nem volt megoldható Mathematica programmal, numerikus megoldását Matlabban implementáltuk. A három megoldás közül azt fogadtuk el biológiailag értelmesnek, amelyben az I_D , I_A és E pozitív számok voltak. A megoldást tartalmazó Matlab file-ok a disszertáció végén, a mellékletben találhatóak (fretWithSatFrust_1.m).

A 68. egyenletrendszert módosítottuk 1:1 arányban jelen lévő donor-akceptor párra, melynek megoldása a mellékletben fellelhető (fretWithSatFrust_2.m).

5. Anyagok és módszerek

5.1. Sejtvonalak

Kísérleteinket SKBR-3, A431 és JY sejtvonalakon végeztük, melyeket az American Type Culture Collections-től (ATCC, Manassas, VA) vásároltunk meg. Az SKBR-3 egy ErbB2-t fokozottan kifejező trastuzumab-szenzitív humán emlő tumor sejtvonal, az A431 egy ErbB1-et fokozottan kifejező humán epiteliális karcinóma sejtvonal, melyeket specifikációjuknak megfelelően 10% fetális borjú szérumot (FCS), 50 µg/ml gentamicint, 2 mM L-glutamint, tartalmazó DMEM-ben tenyésztettük. A JY egy Epstein-Barr vírus transzformált B-limfóma sejtvonal, melyet 10% fetális borjú szérumot (FCS), 50 µg/ml gentamicint, 2 mM L-glutamint, tartalmazó RPMI 1640 médiumban növesztettünk. A sejtenyészeteket 37 °C-on 5% CO₂ jelenlétében tartottuk, és konfluenciától függően 2-3 naponta passzáltuk. Mikroszkópos mérésekhez a sejteket 8 lyukú kamrában növesztettük (Ibidi, Martinsried, Germany) 80%-os konfluenciáig. Szuszpenzióban történő mérésekhez a sejteket tripszin-EDTA-PBS (0,05% tripszin, 0,02% EDTA) oldat segítségével távolítottuk el a flaska aljáról.

5.2. Antitestek

Az ErbB2 fehérjét trastuzumabbal és pertuzumabbal jelöltük, melyek az ErbB2 két különböző, nem átfedő epitópjára specifikus humanizált monoklonális antitestek. A trastuzumabot (Herceptin, IgG₁) a Roche-Hungary (Budapest, Magyarország) cégtől vásároltuk meg, míg a pertuzumabot (Perjeta, 2C4) a Genentech (South San Francisco, CA) ajándékozta nekünk. ErbB1 receptorok jelölésére Mab528 (IgG_{2a}) antitestet használtunk, amit a HB-8509 egér hibridóma sejtek (ATCC) felülszójából nyertünk. Szintén egér hibridóma sejtek segítségével állítottuk elő a W6/32 (IgG_{2a}), MHC-I nehézláncára specifikus monoklonális antitestet, a β-2-microglobulinhoz kötődő L368 (IgG₁) és az MHC-II-t felismerő L243 (IgG_{2a}) antitesteket, amiket F. Brodsky (University of California, San Francisco, CA) adományozott nekünk. AlexaFluor488, AlexaFluor546 és AlexaFluor647 festékek (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) N-hidroxi-szukcinimid észtereit tisztított monoklonális antitestek amino- csoportjához konjugáltuk a gyártó utasításai szerint. A

festék/fehérje jelölési arányt (DOL, hány festékmolekula kötődik egy antitesthez) spektrofotometriával határoztuk meg, melynek értéke 0,5 és 6 között változott az egyes antitest törzsoldatok esetében. Az általunk használt antitesthez konjugált festékek spektrális tulajdonságait az 2. táblázat tartalmazza.

	ex. max. λ [nm]	em. max. λ [nm]	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	QY	LT [ns]
AlexaFluor488	495	519	73000	0,92	4,1
AlexaFluor546	556	573	112000	0,79	4,1
AlexaFluor647	650	668	270000	0,33	1

2. táblázat: A vizsgált antitestekhez konjugált festékek spektrális tulajdonságai (<https://www.thermofisher.com/>).

5.3. Sejtek fluoreszcens jelölése fedőlemezen és szuszpenzióban

A fluorofór szaturációs mérések kivitelezéséhez SKBR-3 sejteket 8 lyukú fedőlemez aljú kamrában növesztettünk 80%-os konfluenciáig. Kétszeri, PBS-sel való mosást (pH:7,4) követően a sejteket fluoreszcens antitestekkel jégen jelöltük 20 μ g/ml-es koncentrációban, 150 μ l, 1% (w/v) BSA-t tartalmazó PBS-ben, 30 percig fénytől védve. FRET mérésekhez a mintákat olyan antitest oldat keverékkel jelöltük, ami tartalmazott donor festékkel, illetve akceptor festékkel jelölt antitesteket. Az α faktor és az átvilágítási faktorok kiszámításhoz szükség volt még donorral vagy akceptorral egyszeresen jelölt mintákra is. A mintákat kétszer mostuk PBS-sel, hogy a nem kötődött antitesteket eltávolítsuk, majd 1%-os formaldehiddel fixáltuk őket. A folyamatot végig jégen végeztük.

A fluorofór konjugációs vizsgálatokhoz A431 és SKBR-3 sejteket használtunk, melyeken Mab528-cal és trastuzumabbal jelöltük az ErbB1 és ErbB2 sejtfelszíni fehérjéket, illetve JY sejteken az MHC-I, MHC-II, és β 2m jelölésére W6/32, L243 és L368 monoklonális antitesteket alkalmaztunk. A fluorofórral konjugált antitestek egyensúlyi kötődésének meghatározására a frissen begyűjtött, illetve tripszinnel kezelt sejteket kétszer mostuk hideg PBS-sel, majd 10^5 sejtet jégen jelöltünk 30 percig sötétben, AlexaFluor546-tal vagy AlexaFluor647-tel jelölt antitestek koncentráció sorozatával 100 μ l, 1 mg/ml BSA-t tartalmazó PBS-ben. A nem kötődött antitesteket kétszeri, PBS-es mosással távolítottuk el, ezt követően fixáltuk a sejteket 1%-os formaldehiddel. A jelöletlen antitestek kötődési

affinitásának a meghatározásához a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, ezt követően 10^5 sejtet jégen jelöltünk 30 percig, fénytől védve a jelöletlen antitest koncentráció sorozatával, állandó koncentrációjú, ugyanarra az epitópra specifikus jelölt antitest jelenléte mellett $100\ \mu\text{l}$, $1\ \text{mg/ml}$ BSA tartalmú PBS-ben. Ezt követően kétszer mostuk a sejteket, majd fixáltuk 1%-os formaldehiddel. A fluoreszcencia intenzitásokat áramlási citométerrel mértük meg. A mért adatokra a jelölt antitestek esetében kötődési görbét (l. 71. egyenlet alább), míg a jelöletlen antitestek esetében kompetitív kötődési görbét (l. 73. egyenlet) illesztettünk, hogy meghatározzuk a jelölt és jelöletlen antitestek K_d értékét. A kötődési görbe esetében elhanyagoltuk az antitest depléciót, tehát azt a jelenséget, hogy az antitest kötődése következtében jelentősen csökken a szabad antitest koncentrációja. Ekkor a szabad antitest koncentrációja jó közelítéssel egyenlő a teljes antitest koncentrációval. A kötődési egyensúlyt ebben az esetben az alábbi egyenletek írják le:

$$\begin{aligned}K_{d1} &= \frac{LA \times R}{LAR} \\R + LAR &= R_{\text{tot}} \\LA &= LA_{\text{tot}}\end{aligned}\tag{70}$$

ahol K_{d1} az antitest-receptor komplex disszociációs állandója, LA , R és LAR a nem-kötött jelölt antitest, a szabad receptor és a receptor-antitest komplex koncentrációit jelölik. R_{tot} és LA_{tot} a receptor és a jelölt antitest teljes koncentrációi. A fenti egyenletrendszer megoldása a jól ismert kötődési egyenlet:

$$LAR = LA_{\text{tot}} \frac{R_{\text{tot}}}{K_{d1} + LA_{\text{tot}}}\tag{71}$$

Jelölt és nem jelölt antitestek kompetíciója esetén az egyensúlyt az alábbi egyenletek írják le (szintén az antitest deplécio elhanyagolása esetén):

$$\begin{aligned}K_{d1} &= \frac{LA \times R}{LAR} \\K_{d2} &= \frac{ULA \times R}{ULAR} \\R + LAR + ULAR &= R_{\text{tot}} \\LA &= LA_{\text{tot}} \\ULA &= ULA_{\text{tot}}\end{aligned}\tag{72}$$

ahol ULA és ULA_{tot} a nem-kötött jelöletlen antitest koncentrációja, ill. a jelöletlen antitest teljes koncentrációja. $ULAR$ a jelöletlen antitest-receptor komplex koncentrációja, míg a K_{d2}

ezen komplex disszociációs állandója. Az egyenletrendszer megoldását az alábbi képlet mutatja:

$$LAR = \frac{K_{d2} LA_{tot} R_{tot}}{K_{d2} LA_{tot} + K_{d1} (K_{d2} + ULA_{tot})} \quad (73)$$

5.4. Sejtek tranziens transzfekciója és az alkalmazott plazmidok

Két fluoreszcens fehérje közötti FRET mérések céljából a SKBR-3 sejteket tranziensen transzfektáltunk olyan fúziós plazmiddal, ami tartalmazott egy linkerrel (RDPPV) összekötött donor EGFP-t és akceptor mCherry-t kódoló fluoreszcens fehérje szekvenciát. A FRET számításokhoz szükséges átvilágítási faktorok kiszámításához pEGFP-C3-mal (Clontech Laboratories, Mountain View, CA), illetve pmCherry-C3-mal transzfektált sejteket használtunk. A plazmidok Volkó Julianna és Vámosi György (Debreceni Egyetem) ajándékai voltak. Az SKBR-3 sejteket nyolc-lyukú fedőlemez aljú kamrában növesztettük, és 0,5 µg plazmidot adtunk hozzá lyukanként. A transzfektált sejteket 2:1 (v/w) lipid/DNS aránnyal, Lipofectamine 2000-rel (Thermo Fisher) állítottuk elő a gyártói útmutató alapján. A fluoreszcens fehérjék spektrális tulajdonságait a 3. táblázat tartalmazza:

	ex. max. λ [nm]	em. max. λ [nm]	ε [M ⁻¹ cm ⁻¹]	QY	LT [ns]
EGFP	488	507	55900	0,6	2,6
mCherry	587	610	72000	0,22	1,4

3. táblázat: Az alkalmazott fluoreszcens fehérjék spektrális tulajdonságai (<https://www.fpbases.org/>).

5.5. Konfokális mikroszkópia

A fluoreszcensen jelölt sejtekről Zeiss LSM 880 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) készítettünk felvételeket. AlexaFluor488-trastuzumab és AlexaFluor546-pertuzumab közötti FRET mérések során a donor molekulát argonion lézer 488 nm-es vonalával gerjesztettük a donor és FRET csatornában, majd az emisszió detektálása 500-530 nm és 550-610 nm között történt a donor, illetve a transzfer csatornában. Az akceptort 543 nm-es HeNe lézerrel gerjesztettük, melynek emisszióját 550-

610 nm-es tartományban detektáltuk. Szintén FRET méréseket végeztünk AlexaFluor546-trastuzumab és AlexaFluor647-pertuzumab között, ahol 543 nm-es lézernyalábbal gerjesztettük az AlexaFluor546 festékmolekulát, melynek emisszióját 550-610 nm között detektáltuk a donor csatornában, még a FRET-szenzitizált akceptor fluoreszcenciát 635-755 nm között mértük. Az AlexaFluor647-pertuzumabot 633 nm-es hullámhosszon gerjesztettük, és az általa emittált fluoreszcenciát 635 nm és 755 nm között detektáltuk. Azért, hogy meghatározzuk a FRET hatásfokot transzfektált sejteken a donort (EGFP) 488 nm-es lézerrel gerjesztettük, és az emisszióját a donor csatornában 495-575 nm között mértük, és a FRET-szenzitizált akceptor emissziót 580-670 nm-es között detektáltuk. Az akceptort (mCherry) 543 nm-es lézervonallal gerjesztettük, melynek emisszióját 575-695 nm közötti hullámhossz tartományban detektáltuk. A fluoreszcens képeket 63X (NA=1,4) olaj immerziós objektívvel készítettük. Egy látómezőről képeket rögzítettünk növekvő lézerintenzitás mellett (1-5-10-15%). A különböző lézerintenzitással felvett képek ugyanarról a látómezőről készültek. Majd egy másik területről vettünk fel képeket csökkenő (15-10-5-1%) gerjesztési intenzitás mellett. A mérések során 32,97 μ s pixelidőt (dwell time) és 1 Airy egységre állított pinhole méretet alkalmaztunk.

5.6. A mobilis fluorofórok szaturációjának mérése

Mobilis fluorofórok szaturációjának mérésére az antitest törzsoldatokat PBS-ben 200 nM-os koncentrációjúra hígítottuk. Mivel az oldatban a fluorofórok mobilisak, ezért a fotoelhalványítás (photobleaching) ebben az esetben elhanyagolható. Ebből a hígított antitest oldatból egy viszonylag nagyobb mennyiséget (200 μ l) adtunk 8-lyukú fedőlemez aljú kamrához. Erre a térfogatra azért volt szükség, hogy elkerüljük a nem kívánatos visszaverődést, ami megtörténne, ha kisebb térfogatú antitest oldat cseppet cseppentenénk a fedőlemezre. A mérés során a fluoreszcencia intenzitást olyan közel mértük a kamra aljához, amilyen közel lehetett az előző pontban említett excitációs és emissziós beállítási paraméterek mellett. A gerjesztő lézerintenzitást először lépésenként növeltük (1-5-10-15%), majd fokozatosan, lépésenként csökkentettük (15-10-5-1%). A két mérést ugyanolyan körülmények között végeztünk, ugyanolyan mérési hibával. A mért fluoreszcencia intenzitásokat a legalacsonyabb gerjesztési intenzitás mellett mért fluoreszcencia intenzitásokra normalizáltuk, majd a normalizált fluoreszcencia értékekre az 54. egyenletet illesztettük.

5.7. Lézerintenzitás mérések

A lézerteljesítmény méréseket Thorlabs (Newton, NJ) optikai teljesítménymérővel (PM100D) végeztük, ami egy 350-1100 nm-es spektrális érzékenységi tartományú szenzorral (S170C) rendelkezik. A mikroszkóp objektívének eltávolítása után a szenzort a mikroszkóp tárgyasztalára helyeztük, és így folytattunk a méréseket. A lézer teljesítményét folyamatos megvilágítás mellett mértük pont szkennelési módban, azért hogy így elkerüljük az időszakos, szakaszos megvilágítást. A mikroszkópon a különböző lézerintenzitásokat (488, 543 és 633 nm) százalékos skálán változtattuk, és a beállított lézerteljesítményt az optikai teljesítménymérővel megmértük. Ezt követően a mért értékeket a fókuszpont méretének, és az egyes fotonok energiájának figyelembe vételével a következőképpen átkonvertáltuk foton-fluxussá. A mikroszkóp technikai specifikációjából ismert volt, hogy 500 μW -os, 488 nm-es lézer és 1,2 numerikus apertúrájú objektív esetén a teljesítménysűrűség $2.58 \cdot 10^5 \text{ W/cm}^2$. A teljesítmény és a teljesítménysűrűség hányadosából a fókuszpont területe, ill. sugara meghatározható az adott objektív és hullámhossz esetében. Az Abbe képlet alapján a fókuszpont nagysága egyenes arányos a hullámhosszal és fordítottan arányos a numerikus apertúrával. Ezen összefüggés felhasználásával az általunk alkalmazott objektívre és hullámhosszakra a fókuszpont nagysága meghatározható.

5.8. Fluoreszcenciás képek elemzése

A mikroszkóppal felvett fluoreszcens képek elemzésére Matlab (MathWorks, Natick, MA) szoftver alatt futó DipImage programot (Delft University of Technology, Delft, Hollandia) használtunk. A képek szegmentálására, a membrán pixelek azonosítására egy egyedileg írt programot alkalmaztunk, amely a kézzel kijelölt vízfeltöltéses algoritmuson („manually seeded watershed algorithm”) alapszik. A FRET hatásfokot és a meghatározásához szükséges minden korrekciós paramétert a Matlabban futó rFRET program segítségével határoztunk meg (<https://peternagy.webs.com/Matlab/rfret/rfret.zip>). A konvencionális és a fluorofór szaturáció jelenségét figyelembe vevő egyenleteket Microsoft Excel-be is beillesztettük, ami az alábbi linken érhető el: https://peternagy.webs.com/Excel/FRET_at_saturation+photon_flux.xlsm

5.9. Áramlási citometria

Az áramlási citometriás méréseket FACS Aria III áramlási citométeren (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NY) hajtottuk végre. Az AlexaFluor546 festéket 561 nm-es lézersugárral gerjesztettük, és emisszióját 595±25 nm-es sávszűrőn keresztül detektáltuk, míg az AlexaFluor647-et 633 nm-en gerjesztettük, és az általa kibocsátott fényt 635 nm-es felülatéresztő szűrő segítségével rögzítettük. A sejtek átlag fluoreszcencia intenzitását egy egyedileg írt programmal (ReFlex) elemeztük, miután az előre és oldal irányú fényszórás adatait tartalmazó pontábrákon (dot plot) kikapuztuk az élő sejtek populációját. Az így kapott átlag fluoreszcencia intenzitásokat a további analízis előtt háttér korrigáltuk.

5.10. Fluorimetria, fluoreszcencia anizotrópia mérése

A fluoreszcencia intenzitás és anizotrópia mérésekre Fluorolog-3 spektrofluorimétert (Horiba Jobin Yvon, Edison, NJ) használtunk. Az AlexaFluor546 festéket 550 nm-en gerjesztettük, és a fluoreszcencia intenzitását 590 nm-en detektáltuk, míg az AlexaFluor647 gerjesztése 650 nm-en történt és az általa emittált fényt 675 nm-en rögzítettük. A gerjesztési és emissziós nyílásokat 10 nm-re állítottuk. 20 nM-os antitest törzsoldatokat készítettünk, majd megmértük a törzsoldatok intenzitását és anizotrópiáját. Az anizotrópiát a 15. képlet szerint, L-formátumban határoztuk meg. Az antitest oldatok és a sejthez kötött antitest frakció fluoreszcencia intenzitásának jelölési aránytól való függésére a 28. és 29. egyenlet illesztettük Matlabban egy globális optimalizáló algoritmus segítségével. Az illesztés során a különböző jelölési arányú antitestek disszociációs állandóját ($K_{d,k}$), ill. az ezen antitestekhez kötött fluorofórok kvantumhatásfokát (Q_k) egy polinomiális összefüggéssel modelleztük [92]:

$$Q_k = k^x, K_{d,k} = K_{d,0} (k+1)^y \quad (74)$$

ahol, Q_k és K_d jelöli egy k fluorofórral rendelkező antitest speciesz kvantumhatékonyságát, illetve disszociációs állandóját, míg a $K_{d,0}$ a jelöletlen antitest K_d -ját adja meg.

Az illesztés során az x és y hatványkitevőket határoztuk meg, olyan módon, hogy a 28. és 29. egyenletek által jósolt intenzitások a lehető legjobban illeszkedjenek a mért értékekre. Bár a kvantumhatásfok és a disszociációs állandó ilyen modellezése nyilvánvaló egyszerűsítés, a fenti paraméterek jelölési aránytól való függésének általános trendjének

jellemzésére mégis jól használhatónak bizonyult a megközelítés. Habár nem tudunk egyetlen olyan elméletet sem, ami az antitest affinitását vagy a festék kvantumhatásfokát a jelölési aránytól hatványosan teszi függővé, mégis ezen formula rugalmassága lehetővé teszi, hogy megfelelően közelítsük, miként csökken a többszörösen jelölt fehérje affinitása és a hozzákapcsolt festék kvantumhatékonysága. Az egyszerűség érdekében, de az általános érvényesség megtartása mellett, azt feltételeztük, hogy az egy kötött fluorofórral rendelkező antitest kvantumhatékonysága egy.

5.11. Sejthez kötött antitestek izolálása immunprecipitációval

Öt millió sejtet jelöltünk szuszpenzióban AlexaFluor546-tal és AlexaFluor647-tel jelölt IgG-vel, majd a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, hogy a nem kötődött antitesteket eltávolítsuk. Ezt követően a sejteket lízis pufferrel (20 mM Tris, 0,1% NP-40, 137 mM NaCl, 10% glycerol, 2 mM EDTA-Na és proteáz inhibitor, pH: 8) jégen lizáltuk 10 percig, amit 5 perces 600 g-s centrifugálás követett, majd a kapott felülúszót immunprecipitáltuk protein G-vel 4 °C-on egy órán keresztül. A mintákat 3-szor mostuk lízis pufferrel, majd 100 mM glicin-HCl oldattal (pH: 3) eltávolítottuk a protein-G-hez kötődött antitesteket. Az eluált antitesteket a felülúszóból nyertük ki, centrifugálást majd foszfát pufferes (pH: 7,4) neutralizálást követően. Kontrollként hígított, 100 nM-os antitest törzsoldatot immunprecipitáltunk, és az előbbieken említett minden lépést végrehajtottunk rajta. Az immunprecipitált minták fluoreszcencia anizotrópiáját párhuzamosan mértük fluoriméteren a nem immunprecipitált mintákkal.

5.12. Fluoreszcencia élettartam mérések

A fluoreszcencia élettartam mérésekre Lambert Instruments LIFA fluoreszcencia élettartam képalkotó modullal és 405-640 nm hullámhossz tartomány közötti modulált LED fényforrással felszerelt inverz, IX81 fluoreszcenciás mikroszkópot (Olympus, Melville, NY) alkalmaztunk. Az AlexaFluor546 gerjesztésére 527 nm-es LED fényt és 510-552 nm-es sávszűrőt alkalmaztunk, majd az általa emittált fény szeparálására 570 nm-es dikroikus tükröt és 590 nm-es felüláteresztő szűrőt használtunk. Az AlexaFluor647 festéket pedig 639 nm-es LED-del gerjesztettük ZET642/20 sávszűrőn keresztül, emisszióját ZT647rdc-UF2 dikroikus tükrő, ET665 felüláteresztő szűrő és ET700/75m sávszűrő segítségével rögzítettük.

Különböző jelölési arányú, 20 µg/ml (~133 nM) koncentrációjú antitest törzsoldatok fluoreszcencia élettartamát a frekvencia doménben határoztuk meg. A látszólagos fluoreszcencia élettartamot a fáziseltolódásból és az emissziós jel modulációjából a következő egyenletek szerint határoztuk meg:

$$\tau_{\phi} = \frac{\tan \phi}{\omega}, \tau_m = \frac{\sqrt{1-m^2}}{m \omega} \quad (75)$$

ahol a τ_{ϕ} és a τ_m a fáziseltolódásból, ill. a modulációból meghatározott látszólagos élettartamok, ω modulációs frekvencia, m és ϕ az emissziós jel modulációját és fáziseltolódását jelzi. Kalibráláshoz nem konjugált festékoldatokat használtunk, és így az AlexaFluor546 és az AlexaFluor647 festékek élettartamát az irodalomból ismert 4,1, illetve 1 ns-os értékre állítottuk.

5.13. Egyedi molekula fluoreszcenciás mérések

Azért, hogy a sejthez kötött antitesteken egyedi molekula méréseket végezzünk, SKBR-3 sejteket 8-lyukú, fedőlemez aljú kamrában növesztettünk, és 10 µg/ml AlexaFluor546-tal vagy AlexaFluor647-tel jelölt trastuzumabbal jelöltük jégén, 30 percig, jelöletlen antitest 500-1000x-es moláris feleslege jelenlétében. A nem kötődött antitesteket kétszeres, PBS-es mosással eltávolítottuk, majd 1%-os formaldehiddel fixáltuk a sejteket. Az egyedi molekula szinten vizsgálni kívánt antitest törzsoldatok esetében az antitesteket immobilizáltuk epoxi funkcionizált fedőlemezek (Nexterion “E,” Schott, Jena, Germany) felszínén 0,1 és 0,05 µg/ml-es koncentrációban. A felvételeket a fedőlemez felszínének közvetlen szomszédságában levő rétegekről készítettük fotonyszámláló módban LSM880 konfokális mikroszkóp (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) segítségével. A fedőlemezhez kötendő szabad antitestek optimális hígítását úgy határoztuk meg, hogy az oldatban µm³-enként ~0,5 antitest legyen. Mivel megjósolhatatlan, hogy az oldatban levő antitestek hány százaléka fog a fedőlemezhez kötődni, így csak a kísérlet során derült ki, hogy ez a hígítás jó választás volt. A sejthez kötött antitestek egyedi molekula vizsgálatához a jelölt antitesteket jelöletlen antitestekkel hígítottuk. Feltételezve, hogy az SKBR-3 sejten ~10⁶ receptor van és hogy felszíne ~500 µm², µm²-enként ~2000 ErbB2 lesz, ami kb. 80 fluoreszcensen jelölt receptor/pixel sűrűséget eredményez, ha egy pixel 0,2 x 0,2 µm. A jelöletlen antitestek 500x és 1000x feleslegének jelenlétében ez a szám 0,08-ra, ill. 0,16-ra csökken. Hangsúlyozni kell,

hogy ezek durva, közelítő számítások voltak, és csak a kísérletek bizonyították be, hogy valóban jó választásnak bizonyultak. Az AlexaFluor546-ot és az AlexaFluor647-et 546 nm, illetve 633 nm-es lézersugárral gerjesztettük, és az emissziójukat 575-680, illetve 638-755 nm-en detektáltuk. A képek analízisére Matlab programot használtunk. A képeket Gauss filterrel simítottuk, amit a helyi maximumok megállapítása követett medián szűrés, szürkeárnyaltos megnyitás (grayscale opening) és kiterjesztett maximum (extended maxima) transzformáció segítségével. Egy körkörös szimmetrikus, kétváltozós normál eloszlást illesztettünk az $I(x,y)$ intenzitásprofilra minden lokális maximuma köré:

$$I(x,y) = bg + \frac{z}{2\pi\sigma^2} e^{-\left(\frac{(x-\mu_x)^2}{2\sigma^2} + \frac{(y-\mu_y)^2}{2\sigma^2}\right)} \quad (76)$$

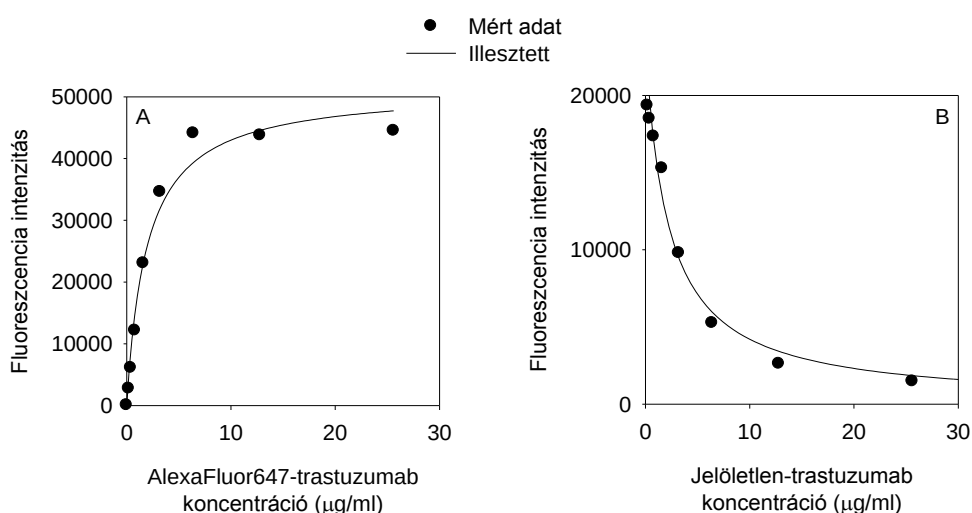
ahol a bg konstans háttér, a z egy skálázási tényező, a σ a standard deviáció, a μ_x és a μ_y a csúcsok koordinátája x , illetve y irányban. A fenti illesztett görbe háttér fölötti határozott integrálja $-\infty$ és ∞ között egyenlő z -vel, ami az adott csúcsnak megfelelő fotonszámmal egyenlő. Ha három standard deviáció távolságon belül több csúcsot találtunk, akkor a csúcsokra több, kétváltozós normál eloszlást illesztettünk egyszerre.

6. Eredmények

6.1. Az antitest jelölés hatása az antitestek affinitására és a festékek fotofizikai tulajdonságaira

6.1.1. Jelölés hatása az antitestek affinitására

A fluoreszcens jelölés antitestek affinitására gyakorolt hatását két különböző fluoreszcens festék (AlexaFluor546 és AlexaFluor647) és öt különböző IgG esetében (trastuzumab, Mab528, W6/32, L368 és L243) vizsgáltuk. A sejtek jelölésére viszonylag magas DOL-lal rendelkező antitest törzsoldatokat választottunk, és áramlási citométerrel határoztuk meg a telítési kötődésüket. Kompetitív kötődési kísérleteket is végeztünk, hogy fényt derítsünk a jelöletlen antitestek kötődési affinitására. A jelölt és jelöletlen antitestek disszociációs állandóját meghatározó reprezentatív mérési adatokat és azok illesztését a 7. ábra mutatja.



7. ábra: AlexaFluor647-trastuzumab kötődése és kompetitív kötődése SKBR-3 sejteken. SKBR-3 sejteket AlexaFluor647-trastuzumab antitest koncentráció sorozatával jelöltünk, majd citometriás mérést követően meghatároztuk az átlag fluoreszcencia intenzitásokat. Ezeket az intenzitásokat ábrázoltuk az antitest koncentráció függvényében. A mért pontokra illesztettük a 71. egyenletet, mellyel a jelölt antitest disszociációs állandója meghatározható (A). A jelöletlen trastuzumab kompetitív kötődését 1,6 µg/ml AlexaFluor647 konjugált trastuzumab jelenléte mellett mértük. A sejthez kötött AlexaFluor647-trastuzumab áramlási citometriás intenzitásait a jelöletlen antitest koncentráció függvényében ábrázoltuk. A mért pontokat a 73. egyenlet szerint illesztettük, így megkaptuk a jelöletlen antitest disszociációs állandóját (B). Az ábrázolt mérés reprezentatív mérés volt.

A megvizsgált antitestek közül egy, az Mab528 antitest nem mutatott különösebb változást AlexaFluor festékekkel történő konjugáció esetében, még a másik négy antitest esetében a disszociációs állandó értéke jelentősen nőtt a jelöléssel (4. táblázat).

antitest	jelöletlen	AlexaFluor546		AlexaFluor647	
	K_d ($\mu\text{g/ml}$)	DOL	K_d ($\mu\text{g/ml}$)	DOL	K_d ($\mu\text{g/ml}$)
trastuzumab	0,8 (0,6-1,1)	3,3	1,1 (0,8-1,5)	3,8	1,8 (1-2,5)
Mab528	0,5 (0,4-0,7)	4,5	0,5 (0,2-0,8)	4,5	0,5 (0,4-0,6)
W6/32	2,1 (1,1-3)	4,7	4,7 (3,3-6,2)	4,4	11,9 (10,2-13,6)
L368	6,6 (5,7-7,5)	4,9	9,2 (7,1-11,1)	3,2	80,8 (32,3-129)
L243	5,4 (4,4-6,3)	3,3	6 (3,7-8,3)	4,5	7 (5,7-8,3)

4. táblázat: Jelölt és jelöletlen antitestek disszociációs állandóinak meghatározása áramlási citométer segítségével. A sejteket jelölt antitestek koncentrációsorozatával jelöltük. Az átlag fluoreszcencia intenzitásokat áramlási citométerrel határoztuk meg, majd a mért értékeket elemezve a jelölt antitestek K_d értékeit az anyagok és módszerekben leírtak alapján számoltuk ki. A jelöletlen antitestek K_d értékének meghatározásához a sejteket inkubáltuk jelölt antitestek fix koncentrációja (~50-70% epitóp szaturáció), illetve jelöletlen antitestek koncentrációsorozata mellett. A fluoreszcencia intenzitásokat áramlási citométerrel mértük meg, majd a mérési eredményeket kiértékelve meghatároztuk a jelöletlen antitestek K_d értékeit. A K_d értékeket 95%-os konfidencia intervallumukkal együtt tüntettem fel. A méréseket SKBR-3 (trastuzumab), A431 (Mab528), és JY (W6/32, L243, L368) sejteken végeztük.

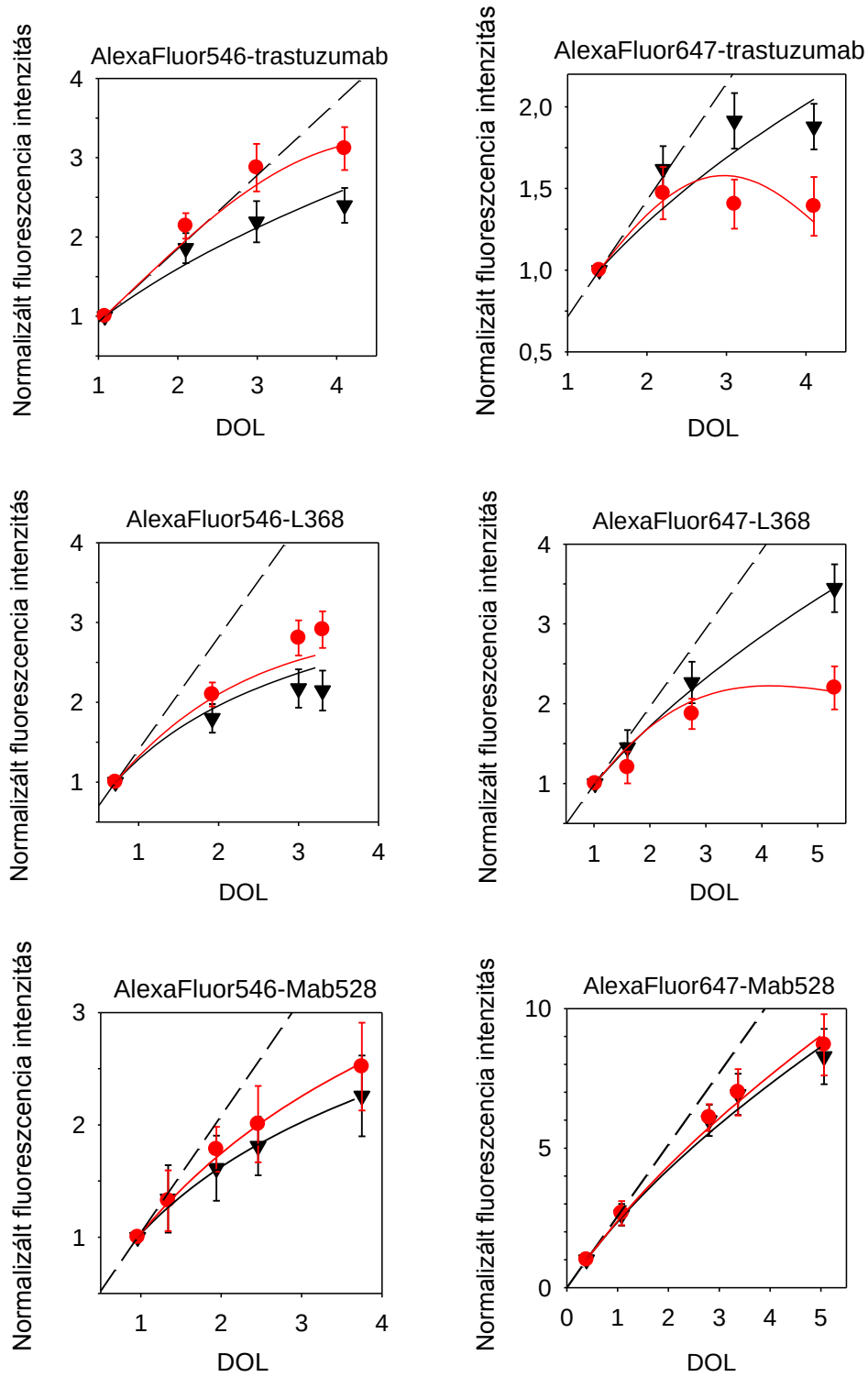
Adataink megerősítik a korábbi bizonyítékokat [47], [50], [51], melyek azt mutatják, hogy a legtöbb esetben a fluoreszcens festékekkel történő konjugáció esetén csökken az antitestek affinitása. Ezenkívül még arra is fényt derítenek, hogy AlexaFluor647-tel történő konjugáció jobban befolyásolja az antitestek affinitását, mint az AlexaFluor546-tal történő jelölés.

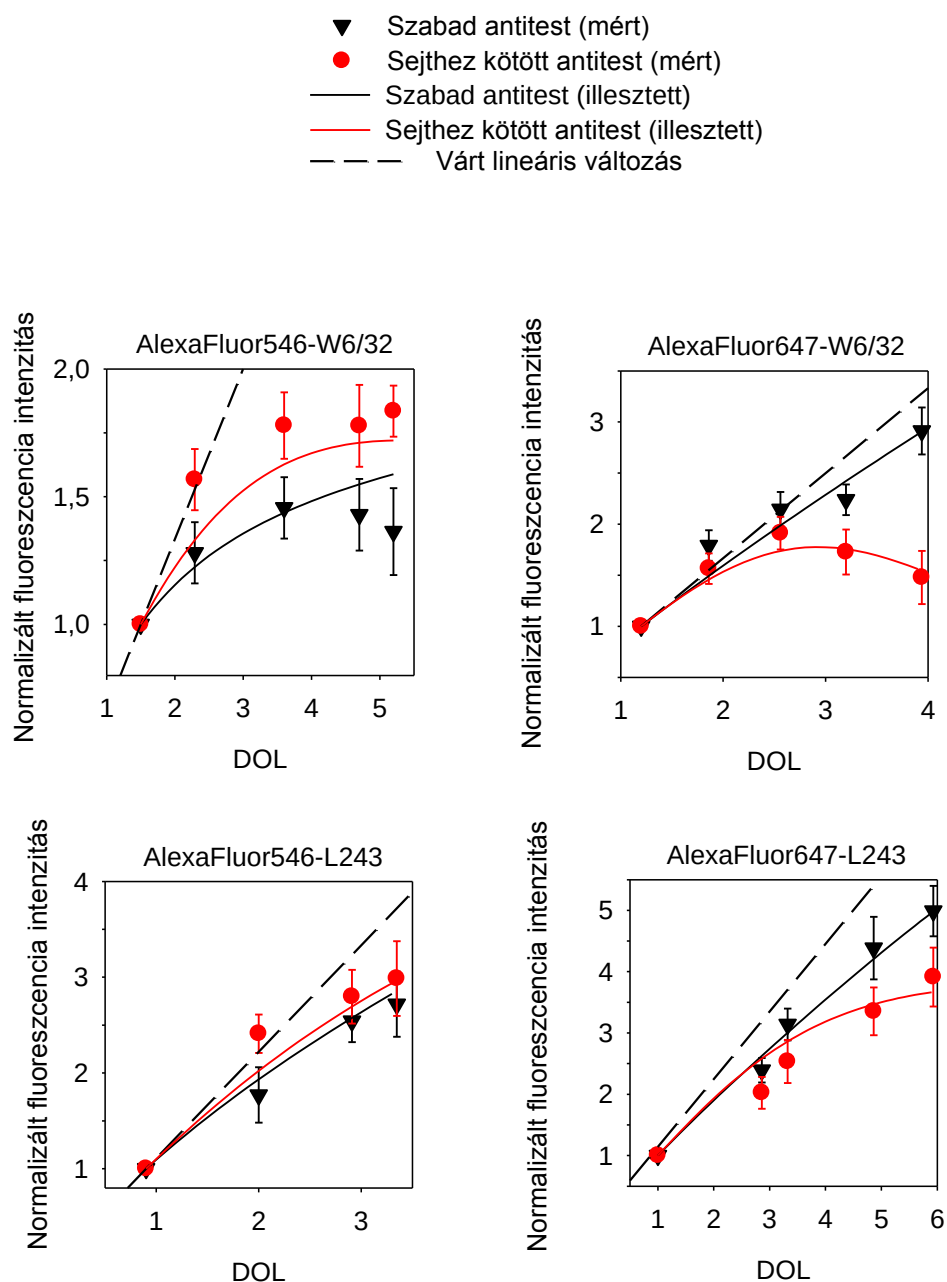
6.1.2. A szabad és kötött antitest fluoreszcencia intenzitása eltérően függ a jelölési aránytól

Egy bizonyos átlagos jelölési aránnyal jellemezhető antitest törzsoldat különböző számú fluorofórral rendelkező antitest specieszeket tartalmaz, melyek eloszlása az oldatban közelítőleg Poisson eloszlást követ. Tekintettel arra, hogy a fluoreszcens jelölés negatívan

befolyásolja az antitestek affinitását, várható, hogy az egyes antitest specieszek disszociációs állandója nő a DOL függvényében ugyanabban a törzsoldatban. Így azok az antitestek, melyek affinitása alacsony, alulreprezentáltak lesznek a sejthez kötött frakcióban. Azért, hogy megvizsgáljuk ezt a felvetést, összehasonlítottuk az antitest törzsoldatok és sejthez kötött antitestek fluoreszcencia intenzitás növekedését a jelölési arány függvényében. A nem kötött antitestek fluoreszcencia intenzitásainak DOL szerinti ábrázolása során az eredmények azt mutatták, hogy ezek az intenzitásnövekedések elmaradtak attól a lineáris növekedéstől, amit akkor várnánk, ha nem lenne önkioltás (self-quenching). A vizsgált antitestek ebben a tekintetben jelentősen különböztek egymástól (8. ábra). Mindezek mellett a kötött frakció fluoreszcencia intenzitásait is meghatároztuk jelölt sejtek segítségével áramlási citometriával. A sejteket olyan antitest törzsoldatokkal jelöltük, melyek fluoreszcencia intenzitását előzőleg már meghatároztuk. Azt tapasztaltuk, hogy a sejthez kötött antitestek intenzitása nem csak elmarad a lineáristól a DOL függvényében, de különbözik is a törzsoldatok görbájától a legtöbb esetben (8. ábra). Szisztematikus különbséget is megfigyeltünk a két vizsgált fluorofór esetében. Míg a sejthez kötött, AlexaFluor546-tal jelölt antitestek legkisebb DOL-ra normalizált fluoreszcencia intenzitása magasabb volt, mint ugyanezen festékkel jelölt antitest törzsoldatok intenzitása, addig AlexaFluor647-tel konjugált antitestek esetében éppen az ellenkezőjét kaptuk. A mért adatokra a 28. és 29. egyenletet illesztettük, feltételezve azt, hogy a kvantumhatékonyság és a K_d értéke a 74. összefüggéssel reprezentálható.

- ▼ Szabad antitest (mért)
- Sejthez kötött antitest (mért)
- Szabad antitest (illesztett)
- Sejthez kötött antitest (illesztett)
- - - Várt lineáris változás





8. ábra: Szabad és kötött antitestek fluoreszcencia intenzitása a jelölési arány függvényében. Különböző jelölési arányú, 20 nM-os antitestek fluoreszcencia intenzitásait fluoriméterrel határoztuk meg. A sejthez kötött antitestek esetében a sejteket az antitestek telítő koncentrációjával jelöltük (SKBR-3 – trastuzumab, A431 – Mab528, JY – W6/32, L243, L368), majd áramlási citométer segítségével megmértük a sejthez kötött frakció fluoreszcencia intenzitását. A mért fluoreszcencia intenzitásokat normalizáltuk a legalacsonyabb DOL esetében mért fluoreszcencia intenzitásra, és ábrázoltuk a DOL függvényében. A hibajelek három mérésből számolt középérték közepes hibáját mutatják. A mért fluoreszcencia intenzitások 28. és 29. egyenletek alapján történő illesztése során a különböző jelölési arányú antitestek disszociációs állandóját ($K_{d,k}$),

ill. az ezen antitestekhez kötött fluorofórok kvantumhatásfokát (Q_k) a 74. összefüggéssel modelleztük. A szaggatott vonal mutatja a várt intenzitást, hogyha az intenzitást lineárisan változna a jelölési aránnyal.

A 74. egyenlettel történő illesztés reprodukálta a mért értékek fő tendenciáját, tehát azt, hogy az AlexaFluor546 esetében a sejthez kötött, DOL függő normalizált intenzitások magasabbak, mint a szabad antitestek DOL függő normalizált intenzitásai, míg az AlexaFluor647 esetében a tendencia fordított (8. ábra). Az illesztés megmutatta azt is, hogy az antitest jelölés az AlexaFluor546 festék kvantumhatékonyságát nagymértékben befolyásolja, míg AlexaFluor647 elsődlegesen az antitest affinitására gyakorol hatást (5. táblázat).

Antitest	AlexaFluor546				AlexaFluor647			
	A		A Kd kitevője		A		A Kd kitevője	
	érték	SD	érték	SD	érték	SD	érték	SD
Trastuzumab	-0,41	0,09	2,34	0,31	-0,44	0,1	5,6	0,82
Mab528	-0,6	0,13	0,46	0,1	-0,27	0,06	0,11	0,03
W6/32	-0,79	0,14	1,21	0,23	-0,14	0,04	4,4	0,9
L368	-0,7	0,19	0,76	0,14	-0,34	0,07	1,67	0,31
L243	-0,31	0,1	0,8	0,13	-0,12	0,04	1,39	0,25

5. táblázat: A fluoreszcenciás jelzés kvantitatív hatása az antitest affinitására és a festék kvantumhatásfokára. A kitevők a kötött frakciók és az antitest törzsadatainak DOL függő fluoreszcencia intenzitásának illesztésből származnak. A DOL függő fluoreszcencia intenzitások a 8. ábrán láthatóak, melyeket a 28. és 29. egyenletek alapján illesztettük. Egy fluorofór relatív kvantumhatásfoka egy k számú festékkel rendelkező antitest esetében a következő egyenlettel modellezhető $Q_k = k^x$. A modell szerint a k számú fluorofórral jelölt antitest disszociációs állandója ($K_{d,k}$) a $K_{d,k} = K_{d,0} (k+1)^y$ egyenlet szerint változik, ahol a $K_{d,0}$ a jelöletlen antitest disszociációs állandója (4. táblázat). Minél nagyobb a kvantumhatásfok vagy a K_d kitevőjének abszolút értéke, annál jelentősebb a jelölés hatása az adott paraméterre. A méréseket SKBR-3 (trastuzumab), A431 (Mab528), és JY (W6/32, L243, L368) sejteken végeztük.

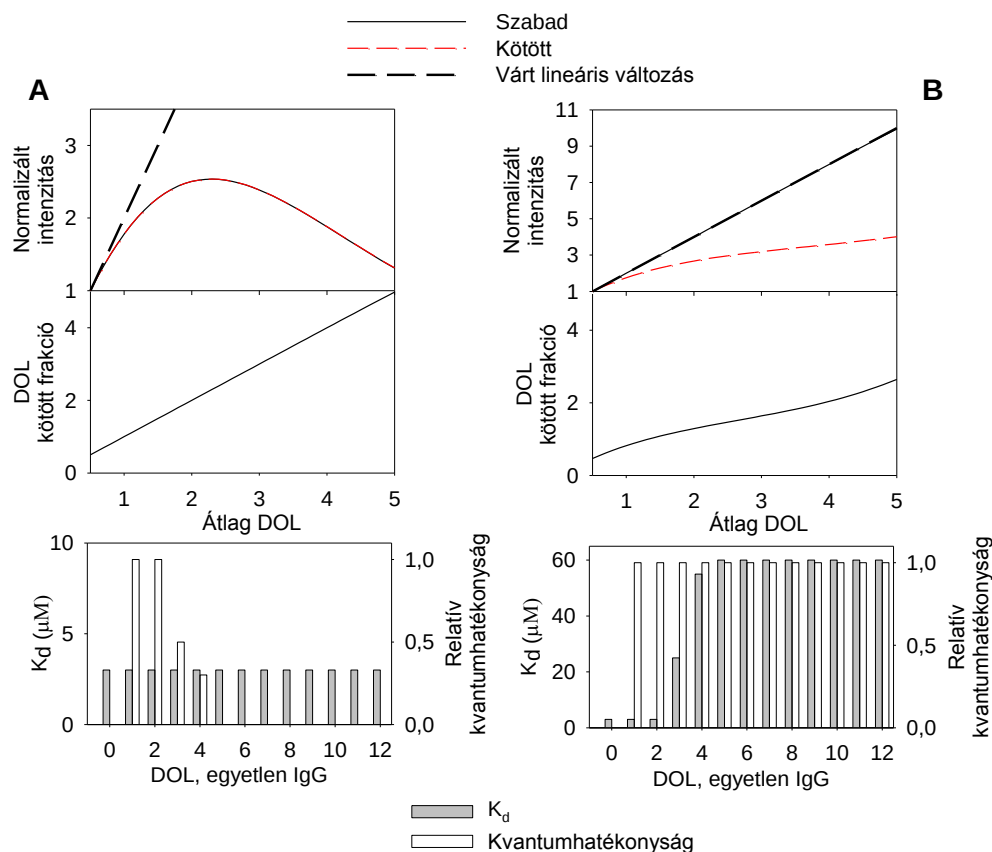
Mivel a modell egyes feltételezései elhanyagolják a fluorofórral jelölt antitestek valós viselkedésének egyes aspektusait (pl.: ligand deplécio hiánya, antitest specieszek Poisson eloszlása), ezért az általa jósolt eredményeket elővigyázatosággal kell értelmezni. Mindezek

ellenére az illesztésre alkalmazott modell mégis jelentős eredményt adott, egyértelmű információt a mögöttes folyamatokról, melyek egybevágtak a kísérleti eredményeinkkel (pl.: a jelölés hatása az antitestek affinitására l. 4. táblázat). Levonható az a következtetés, hogy a kötött és a szabad antitestek fluoreszcenciája eltérően függ a jelölési aránytól. Ez az eredmény alátámasztja azt a hipotézisünket, miszerint ugyanabban a törzsoldatban lévő, különböző DOL-lal rendelkező antitest specieszek eltérő affinitással rendelkeznek. Továbbá még az is nyilvánvalóvá vált, hogy a kötött és nem kötött antitestfrakciók jelölési aránya eltérő.

6.1.3. A szabad és kötött antitestek fluoreszcencia intenzitásainak szimulálása

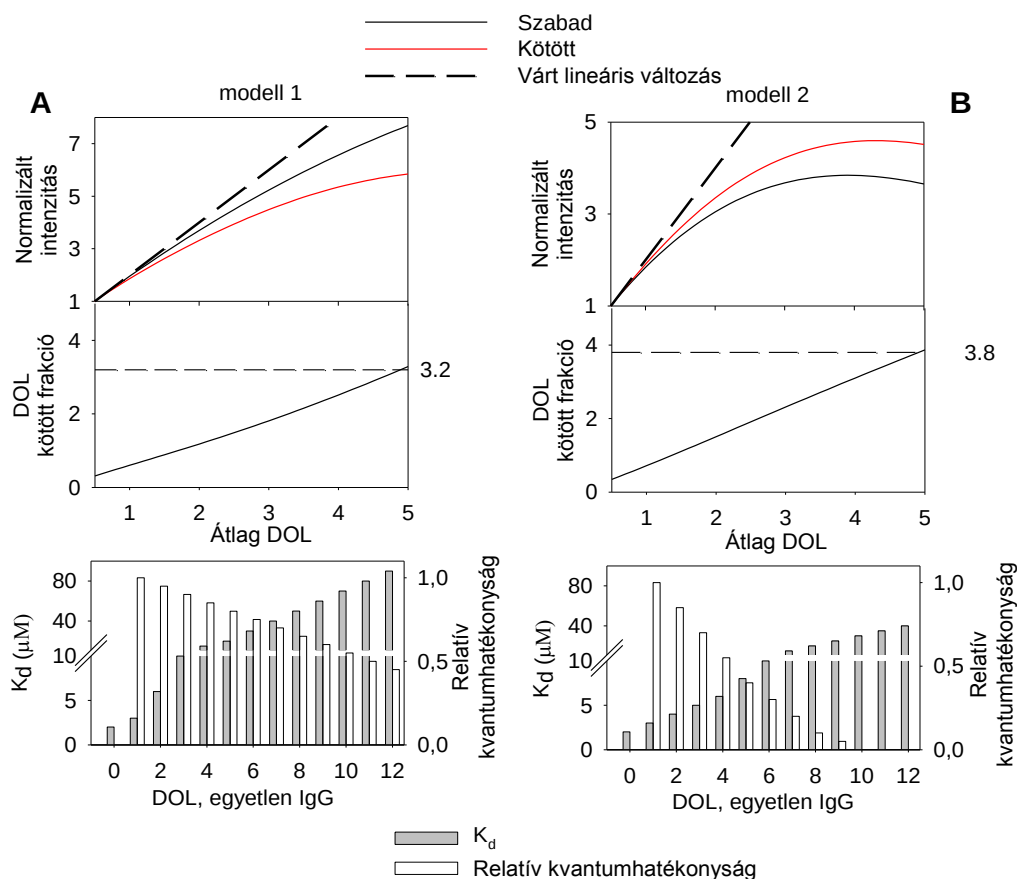
Az előző fejezetben bemutatott eredményeink értelmezése arra utal, hogy fluorofórfüggő változások történnek a kvantumhatékonyságban, és az antitestek affinitásában a jelölés hatására. A továbbiakban szerettünk volna kvantitatív magyarázatot adni a két különböző AlexaFluor festék eltérő viselkedésére. A modell részletei már az elméleti és anyagok-módszerek részben bemutatásra kerültek.

Azt feltételezzük, hogy egy antitest törzsoldat különböző jelölési arányú antitest specieszeket tartalmaz. Ezek a fluoreszcensen jelölt IgG specieszek más-más affinitással és kvantumhatékonysággal rendelkeznek, és versenyeznek ugyanazon epitóp kötéséért. A törzsoldat és a kötött frakció jósolt fluoreszcencia intenzitását a 28. és 29. egyenlet alapján határoztuk meg, négy különböző esetben. Az eredmények két határesetét a 9. ábra mutatja.



9. ábra: Modellszámítás az antitest törzsoldatok és ezek kötött antitest frakcióinak fluoreszcencia intenzitás meghatározására. Azt feltételezzük, hogy egyetlen antitest molekula fluoreszcencia kvantumhatásfoka és disszociációs állandója ezen egyetlen molekula jelölési arányától függ. Az A részben (bal oldali ábrák) az antitestek affinitása független a jelölési aránytól, ugyanakkor a kvantumhatékonyságuk azzal arányosan csökken. A B részben (jobb oldali ábrák) a kvantumhatékonyság állandó és az antitest affinitás csökken a növekvő F/P-vel. A kvantumhatékonyság és a disszociációs állandó függését egyetlen IgG esetében a jelölési aránytól az alsó ábrák mutatják. Feltételezzük, hogy egy antitest törzsoldat különböző DOL-lal rendelkező egyedi antitesteket tartalmaz, melyek eloszlása Poisson eloszlást követ. Az antitest törzsoldatok és a sejthez kötött frakció fluoreszcencia intenzitását a már említett 28. és 29. egyenlet alapján szimuláltuk (felső ábrák). A sejtekhez kötött görbék kiszámításához 50 $\mu\text{g/ml}$ antitest koncentrációt feltételeztünk. Annak érdekében, hogy az ábrák összehasonlíthatóak legyenek a mért kísérletes eredményekkel (8. ábra), a számolt értékeket is normalizáltuk a legkisebb DOL-ra. A szaggatott fekete vonal azt mutatja, hogy a fluoreszcencia intenzitás hogyan függene a DOL-tól, hogyha a jelölés nem befolyásolná sem a disszociációs állandót, sem a kvantumhatékonyságot. A sejthez kötött frakció átlagos jelölési arányát a középső ábrák mutatják. A bal felső ábrán csak a piros vonal látszik, mivel a piros és fekete görbék egymással átfednek.

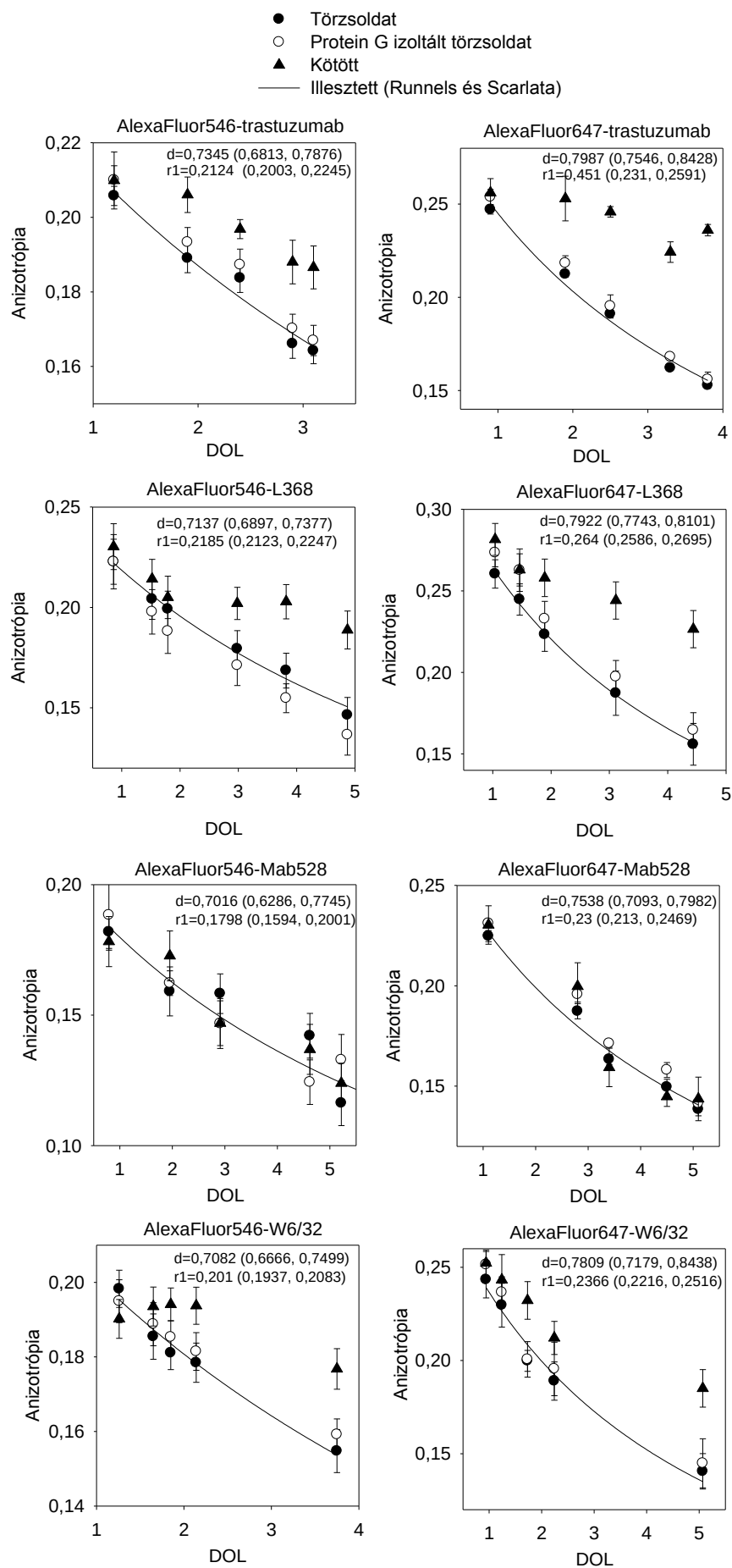
Ha a fluoreszcens jelölés nem befolyásolja az antitest affinitását, akkor a törzsoldat és a kötött frakció normalizált fluoreszcencia intenzitása teljesen átfedne annak ellenére, hogy a kvantumhatékonyság csökkenne a DOL növekedésével. Ha a kvantumhatékonyság állandó, de az antitestek affinitása csökken magas DOL hatására, akkor a törzsoldat fluoreszcenciája lineárisan nőne, míg a kötött antitestek normalizált fluoreszcencia intenzitása kevésbé meredeken emelkedne. Látható, hogy triviális esetekben a modell megjósolja a várt eredményeket. A továbbiakban két összetett modellt elemeztünk, ahol a jelölés mind az antitest affinitását, mind a festék kvantumhatékonyságát befolyásolja. Az 1. modell esetében az antitest affinitás romlása a hangsúlyosabb, míg a 2. modellben a kvantumhatékonyság érzékenyebb a jelölésre. Az 1. és 2. modell visszaadja a két AlexaFluor festék eltérő viselkedését. A 2. modellnél a kötött antitestek normalizált fluoreszcencia intenzitása magasabb, még az 1. modellt vizsgálva ez fordított, az antitest törzsoldatok intenzitása volt magasabb (10. ábra). Ha a fluoreszcens jelölés sokkal inkább a kvantumhatékonyságot befolyásolja, mint az antitest affinitást, akkor a kötött frakció normalizált intenzitása várhatóan nagyobb lesz, ami az AlexaFluor546 esetére volt jellemző. Másrészt, ha az antitest affinitás sokkal érzékenyebb a fluoreszcens jelölésre, mint a kvantumhatékonyság, akkor a törzsoldatok normalizált intenzitása lesz magasabb. Ez jellemzi az AlexaFluor647 esetét (8. ábra). Annak ellenére, hogy a törzsoldatok akár 5-ös F/P-vel is rendelkeznek, a kötött antitestek jelölési aránya mégis ~3-4 körül maradt. Ez arra enged következtetni, hogy a kötött frakció jóslt átlagos fluoreszcencia intenzitása kisebb, mint a törzsoldatoké mindkét modell esetében.

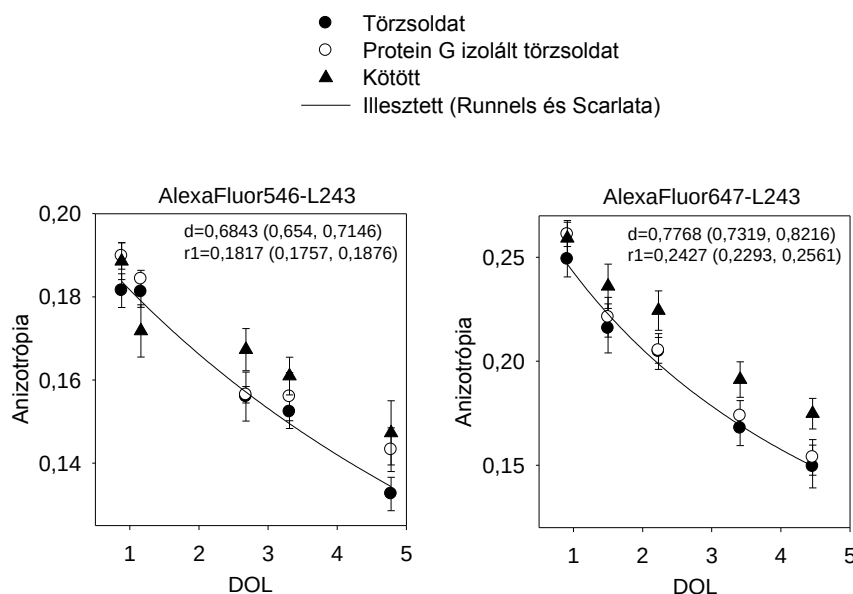


10. ábra: Antitest törzsoldatok és ezek kötött frakcióinak fluoreszcencia intenzitásaival kapcsolatos modellszámítások. Azt feltételeztük, hogy egyetlen antitest molekula kvantumhatékonysága és disszociációs állandója ezen egyetlen molekula jelölési arányától függ. Az 1. (A, baloldali grafikonok) és 2. modellben (B, jobb oldali grafikonok) mind az antitest affinitását, mind a festék kvantumhatékonyságát jelentősen befolyásolja a jelölés. Az alsó ábrák mutatják, hogy a modellben szereplő feltételezés szerint hogyan függ a kvantumhatékonyság és a disszociációs állandó a jelölési aránytól egyetlen IgG molekula esetében. Azt is feltételeztük, hogy egy bizonyos átlagos DOL-lal rendelkező antitest törzsoldatban előforduló, különböző jelölési aránnyal rendelkező antitest specieszek eloszlása Poisson eloszlással jellemezhető. Ezen antitest törzsoldatok és a kötött frakcióik fluoreszcencia intenzitását a már említett 28. és 29. egyenlet szerint modelleztük (felső ábrák). A sejthez kötött görbék kiszámításához 20 $\mu\text{g/ml}$ -es antitest koncentrációt feltételeztünk. Annak érdekében, hogy ezek a grafikonok összehasonlíthatóak legyenek a kísérletes eredményeinkkel (8. ábra), az értékeket normalizáltuk a legalacsonyabb DOL-ra kiszámolt értékhez. A szaggatott vonal jelzi a várt fluoreszcencia intenzitást, ami abban az esetben következne be, ha a fluoreszcens jelölés nem befolyásolná sem a kvantumhatékonyságot, sem az antitestek affinitását. A középső ábrákon látható a sejthez kötött antitest frakció átlagos jelölési aránya.

6.1.4. A kötött antitest frakció jelölési arányának meghatározása fluoreszcencia anizotrópia mérésekkel

Habár az előző fejezetekben bemutatott kísérletes eredményeink és a modellezés rámutatott a kötött és nem kötött antitest frakciók jelölési arányainak különbségére, megpróbáltunk egy független módszert találni, hogy ezeket az eredményeket megerősíthessük. Mivel a homo-FRET érzékeny mérési lehetőséget nyújt arra, hogy meghatározzuk hány spektroszkópiailag azonos molekula van Förster távolságon belül [88], [92]–[95], ezért fluoreszcencia anizotrópia méréseket végeztünk. A sejteket különböző F/P-jű antitest törzsoldatokkal jelöltük, majd lizálást és immunprecipitációt követően visszanyertük a sejtekhez kötött antitest frakciót. Ezt követően megmértük az izolált antitestek és a törzsoldatok anizotrópiáját egyaránt. Azért, hogy megvizsgáljuk, van-e az immunprecipitációnak bármilyen hatása az antitestekre, illetve méréseinkre, az alkalmazott antitest oldatokat ugyanúgy immunprecipitáltuk mint ahogyan a sejtes mintákat. A törzsoldat fluoreszcencia anizotrópiája csökken a jelölési arány függvényében a 34. és a 35. egyenlet szerint. A kezeletlen és immunprecipitált antitest törzsoldatok anizotrópiája nem különbözik egymástól, ami arra enged következtetni, hogy a sejteken alkalmazott immunprecipitációnak nincs jelentős hatása az anizotrópiára (11. ábra). Másrészt a sejthez kötött antitestek anizotrópiája jellemzően magasabb volt, mint a törzsoldatoké mind a két AlexaFluor festék esetében. Ez arra utal, hogy a sejthez kötött antitestek jelölési aránya alacsonyabb. Bizonyos esetekben (pl.: AlexaFluor647-trastuzumab, AlexaFluor546-L368, AlexaFluor647-L368) a sejthez kötött antitestek anizotrópiája alig csökkent, annak ellenére, hogy a sejteket egyre magasabb F/P-jű oldatokkal jelöltük meg. Ez arra enged következtetni, hogy szinte csak alacsony jelölési aránnyal rendelkező egyedi antitest molekulák kötődtek a sejtekhez. Az Mab528-as antitest kivételt képezett a szabály alól. Esetében mind a három anizotrópia görbe szinte tökéletesen átfed egymással, megerősítve azt, hogy ebben az esetben a fluoreszcens jelölésnek nincs jelentős hatása az antitest affinitására, mint ahogy látható volt a 8. ábrán.

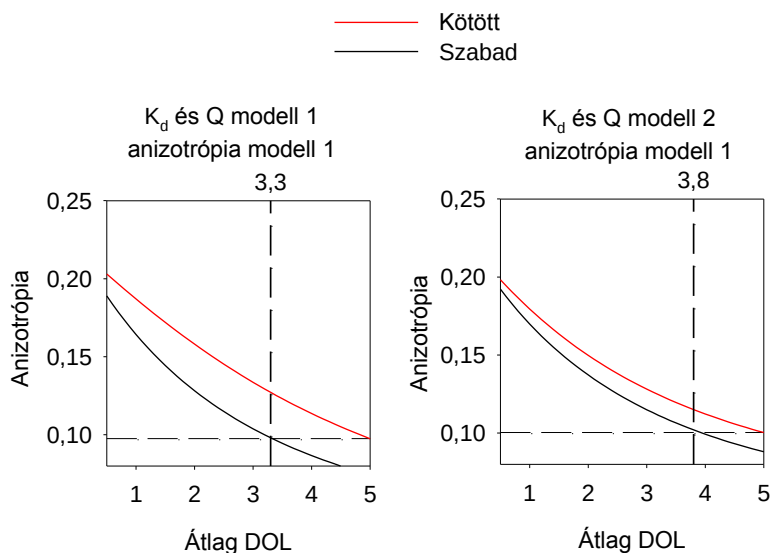




11. ábra: Antitest törzsoldatok és sejthez kötött antitestek anizotrópiája a jelölési arány függvényében. 20 nM-os koncentrációjú, különböző jelölési arányú antitest oldatok fluoreszcencia anizotrópiáját fluorimetriával határoztuk meg (●). Az átlag anizotrópia értékeket Runnels és Scarlata 34. egyenlete szerint illesztettük. Az illesztés eredménye az ábra jobb felső sarkában látható ($d=R_0/R$, r_1 pedig az antitestben lévő egyetlen fluorofór becsült anizotrópiája; a zárójelben 95%-os konfidencia intervallum látható). Antitest törzsoldatokat (○) és antitestekkel jelölt sejteket (▲) immunprecipitáltunk protein G-vel, majd az izolált antitestek anizotrópiáját fluoriméterrel mértük meg. A hibajelek a középérték közepes hibáját mutatják (n=3-5).

Habár úgy látszik, az AlexaFluor546-tal és AlexaFluor647-tel történő konjugáció eltérő módon befolyásolja az antitestek affinitását a 8. ábra alapján, az anizotrópia mérések (11. ábra) ugyanazt a tendenciát mutatják mind a két festék tekintetében. A továbbiakban az előző fejezetben bemutatott modellt alkalmaztuk, melyet úgy bővítettük ki, hogy vegye figyelembe a fluorofórok között lejátszódó homo-FRET függő anizotrópiát (l. részletesebben az „Elmélet” fejezetben) a törzsoldatok, illetve a kötött frakció esetében. A számítások eredménye megjósolja, hogy a kötött antitestfrakció magasabb fluoreszcencia anizotrópiával jellemezhető függetlenül attól, hogy a festékekkel történő konjugáció hogyan befolyásolja az antitest affinitását (12. ábra). Az antitest törzsoldatok anizotrópiáját kalibrációs görbeként használtuk, és ezekről az ábrákról leolvastuk a kötött frakció átlagos jelölési arányát (ezt a célkereszt mutatja a 12. ábrán). A kötött frakció átlagos DOL-ja, amit az anizotrópia görbékből határoztunk meg, rendkívül jól megegyezik a 10. ábrán bemutatott számításokkal,

ami azt mutatja, hogy az anizotrópiamérések alkalmazhatóak a kötött frakció DOL meghatározására. A kísérletes eredményeink és a modellszámítások arra engedtek következtetni, hogy a sejthez kötött antitest átlagos jelölési aránya jellemzően alacsonyabb, mint a törzsoldatok jelölési aránya.

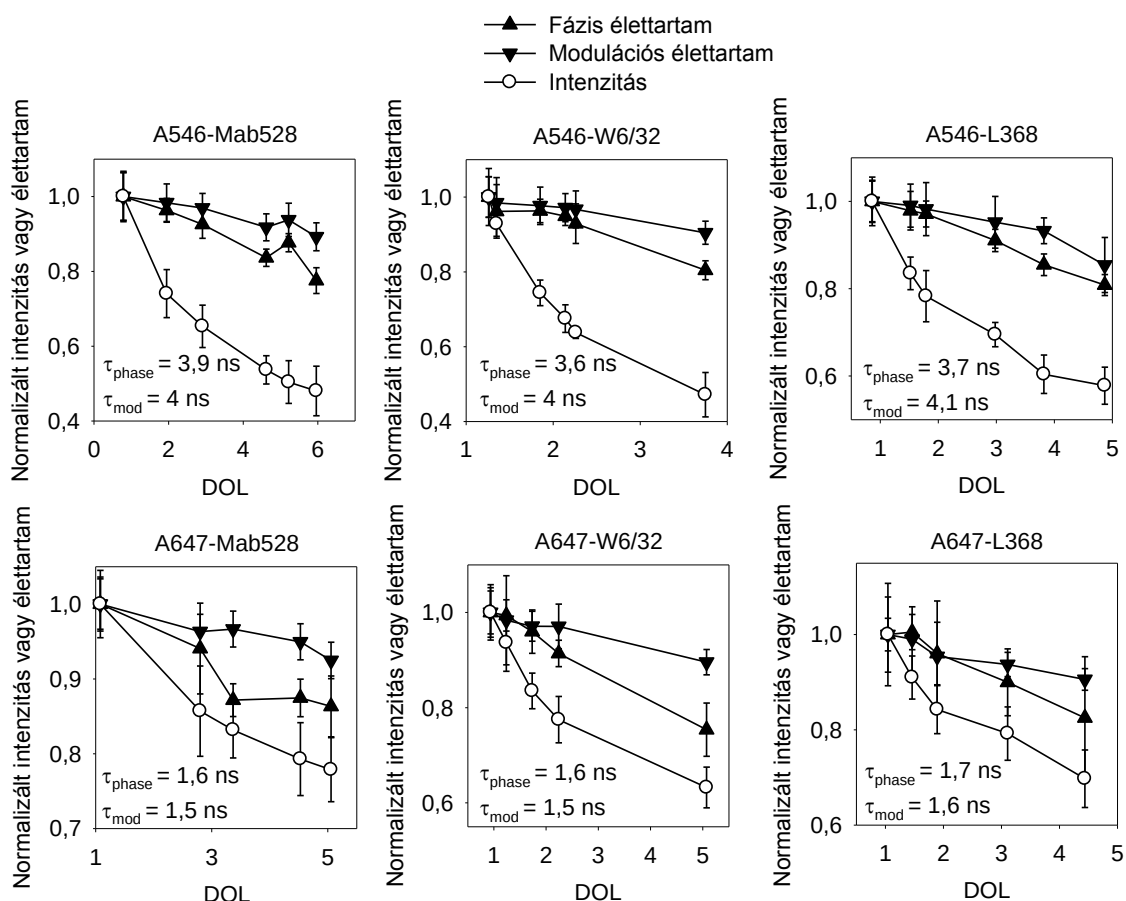


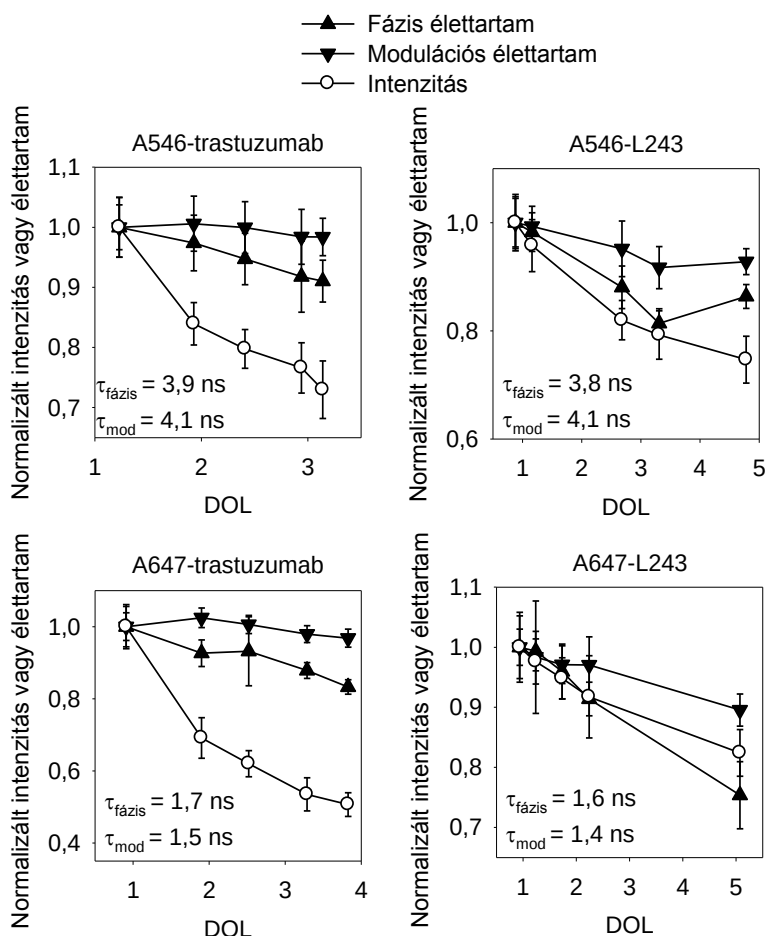
12. ábra: Antitest törzsoldatok (fekete görbe) és azok sejthez kötött frakcióinak (piros görbe) anizotrópiájának szimulációja. Olyan antitest oldatokat feltételeztünk, amiben a különböző jelölési arányú antitestek eloszlása Poisson eloszlást követ. Az antitest törzsoldatok és azok kötött frakcióinak anizotrópiáját a 32. és 33. egyenlet alapján modelleztük. A szimulációt hat különböző feltétel mellett végeztük el. “ K_d és Q modell 1” és “ K_d és Q modell 2” megfelel a 10. ábrán bemutatott 1. és 2. modellnek. Röviden, a megnövekedett DOL hatására az 1. modell esetében az affinitás csökken, még a 2. modellben inkább a kvantumhatékonyság. Az anizotrópia modellt az elméleti rész ismerteti, mely szerint az anizotrópia a 35. egyenletnek megfelelően változik. A célkeresztek segítenek azonosítani a kötött frakció átlagos jelölési arányát, melynek számmal kifejezett értéke az adott grafikon felett látható, amikor az antitest törzsoldat jelölési aránya öt.

6.1.5. Az antitest jelölés hatása a fluoreszcencia élettartamra és a fluorofórok spektrumára

Az előző fejezetekben bemutatott eredmények arra engednek következtetni, hogy egy többszörösen jelölt fluoreszcens antitest csökkent fényességgel rendelkezik. Kíváncsiak voltunk arra, hogy statikus vagy dinamikus kioltás áll-e a jelenség háttérében, ezért fluoreszcencia élettartam méréseket végeztünk a frekvencia doménben antitest törzsoldatok

híg oldatával. Meghatároztuk az AlexaFluor546-tal és Alexafluor647-tel jelölt antitestek látszólagos fázis és modulációs élettartamát, majd az eredményeket normalizáltuk a legkisebb DOL-lal rendelkező antitest esetében mért élettartamra. Ugyanazon antitest törzsoldatok fluoreszcencia intenzitását külön-külön meghatároztuk fluoriméterrel, majd szintén normalizáltuk a legalacsonyabb DOL-lal rendelkező antitest fluoreszcencia intenzitására, és a normalizált élettartam mellett a DOL függvényében ábrázoltuk (13. ábra). Noha a normalizált fluoreszcencia élettartam csökkent a növekvő DOL-lal, ezen változás mértéke mégis sokkal kisebb volt, mint a normalizált fluoreszcencia intenzitás változása, ami azt jelenti, hogy a csökkent kvantumhatékonyság részben statikus kioltásnak köszönhető. Az L243 antitest határozottan kivételt képezett, mert az élettartam csökkenés mértéke majdnem akkora volt, mint a fluoreszcencia intenzitás csökkenése (13. ábra).

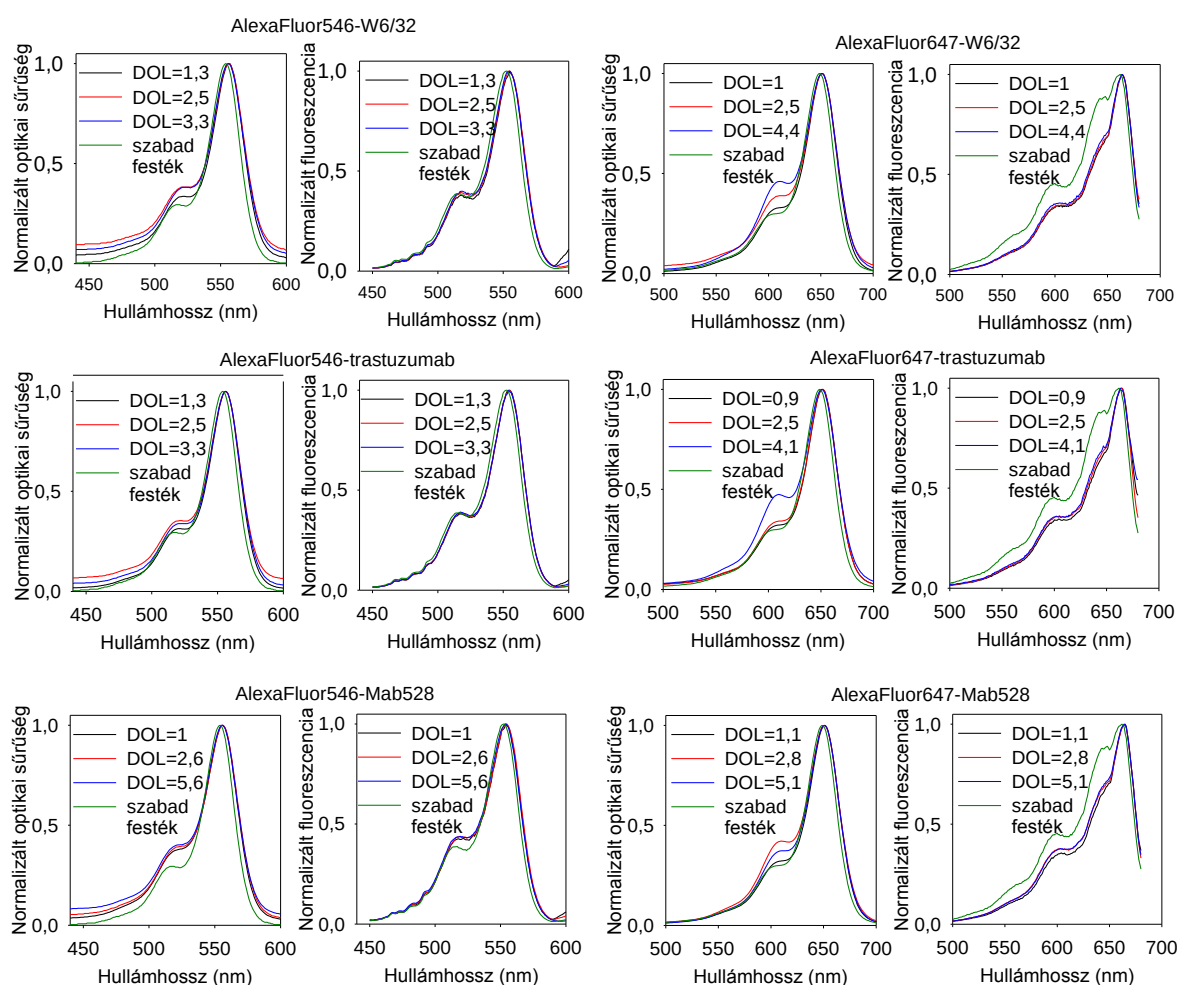


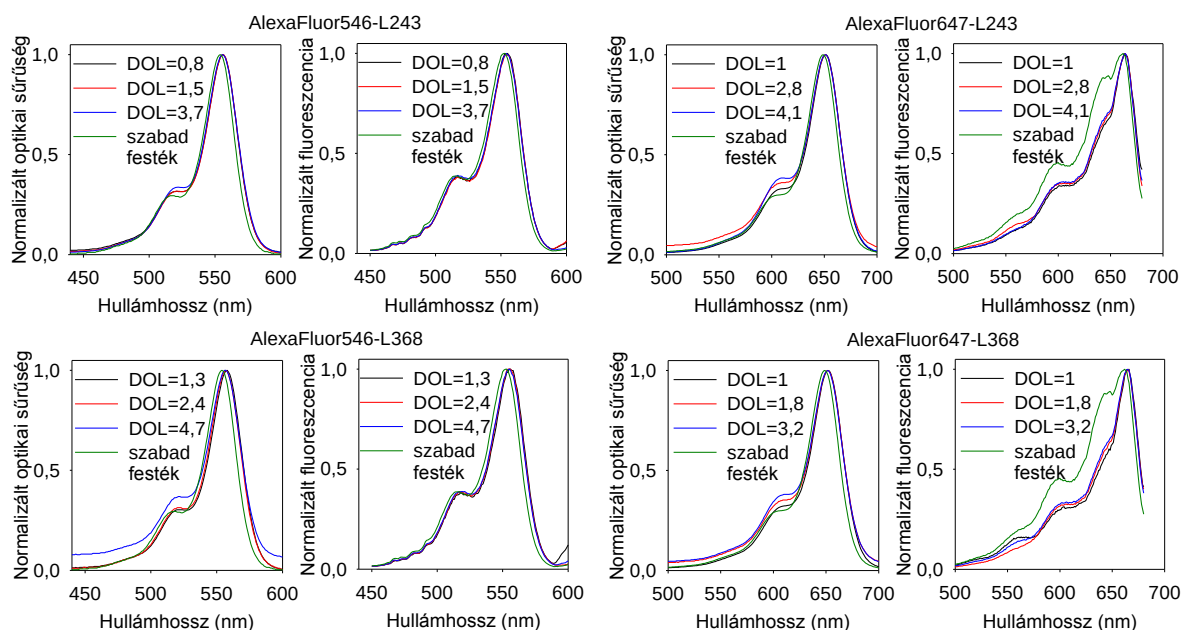


13. ábra: Különböző jelölési aránnyal rendelkező antitest törzsoldatok fluoreszcencia élettartama és intenzitása. Az antitestek fluoreszcencia élettartamát a frekvencia doménben határoztuk meg, majd ezt követően a legkisebb jelölési arányú antitest élettartamára normalizáltuk. A legalacsonyabb DOL-értékkel rendelkező antitest nem normalizált fluoreszcencia élettartama minden ábrán látható. Ugyanezen oldatok fluoreszcencia intenzitását fluoriméterrel határoztuk meg, és a fluoreszcencia intenzitásokat az összehasonlíthatóság kedvéért normalizáltuk a DOL-ra és a legkisebb DOL-lal rendelkező antitest intenzitására. A hibajelek a középérték közepes hibáját mutatják (n=3).

Azért, hogy kiderítsük hogy a nem fluoreszcens dimerek, másnéven H-aggregátumok [96] hozzájárulnak-e a kioltás folyamatához, felvettük a fluorofórral konjugált antitestek abszorpciós és gerjesztési spektrumát. Az abszorpciós spektrumokban a fő abszorpciós sávhoz képest kék irányban eltolódott csúcs megjelenése és DOL-függő növekedése, és ennek a sávnak a hiánya az excitációs spektrumokban azt jelenti, hogy nem fluoreszcens festék aggregátumok vannak jelen (14. ábra). A szabad, nem konjugált festékek abszorpciós spektruma monomer specieszek spektrumát jelenti. Ezt két tényező bizonyítja: (i) a 3 és 10

μM -os festékkoldatok spektruma teljesen átfedett egymással (be nem mutatott adat); (ii) a cianin típusú festékek köztudottan nem aggregálódnak alacsony mikromólos koncentrációban [97]. Ennek ellenére egy kis csúcs mégis megfigyelhető a fő abszorpciós sáv mellett a rövidebb hullámhossz tartományánál, melyek jelenléte a vibrációs átmenetnek tulajdonítható [97]. AlexaFluor647 festék esetében az antitesthez kötött festékek gerjesztési spektruma eltér a szabad festékétől, míg AlexaFluor546 esetében a görbék átfednek egymással. A cianin festékekről ismert, hogy cisz- és transz-izomereket képeznek, melyek spektroszkópiailag enyhén eltérnek egymástól. Ez okozhatta a különbséget AlexaFluor647 festékekkel történő konjugáció esetében a szabad festékekhez képest [98]. Összegzőként elmondható, hogy az élettartam mérések és a spektrális adatok összhangban vannak: a fluoreszcencia kioltáshoz a festék aggregátumok jelentősen hozzájárulnak.



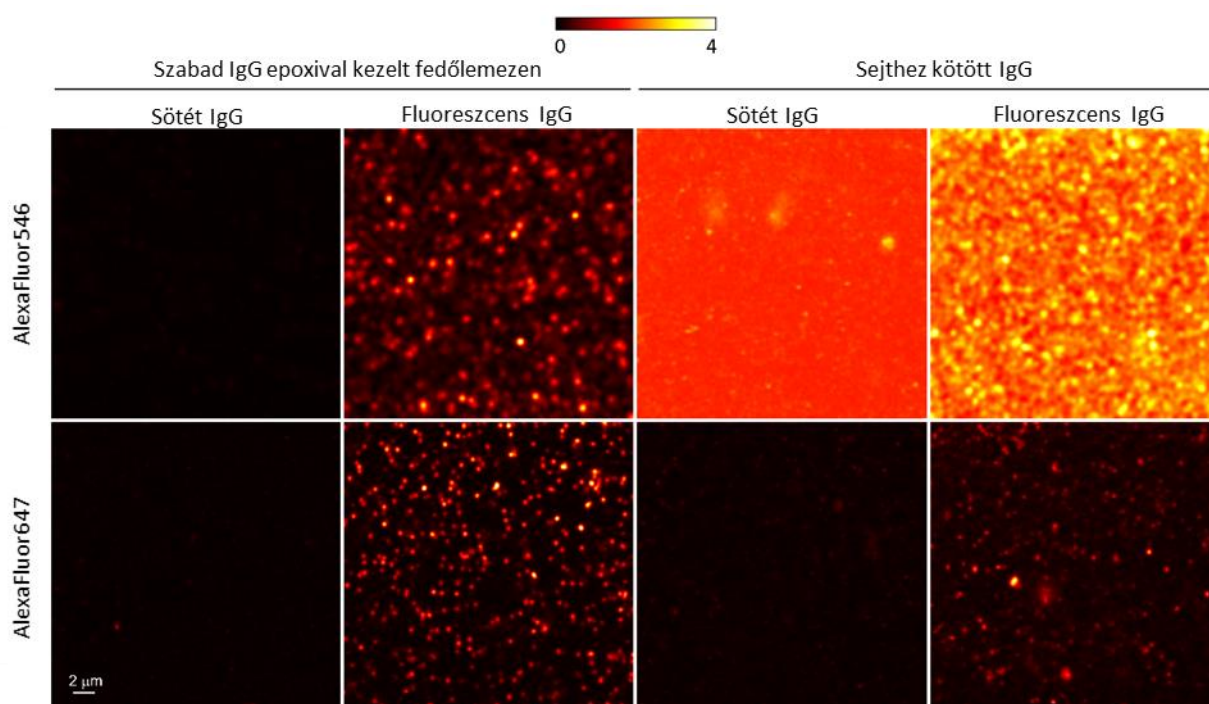


14. ábra: Az AlexaFluor546 és AlexaFluor647 szabad és antitesthez konjugált festékek abszorpciós és gerjesztési spektrumai. Az 3 μM -os koncentrációjú fluorofórral konjugált antitest oldatok abszorpciós spektrumát fotométerrel rögzítettük. A gerjesztési spektrumok felvételekor 20 nM-os antitest oldatokat használtunk és AlexaFluor546 esetében 610 nm-en, míg AlexaFluor647 esetében 690 nm-en mértük az emissziót. A spektrumokat normalizáltuk a csúcserőtekekre. A nem konjugált szabad festékek esetében az abszorpciós és excitációs spektrumokat 3 μM -os, illetve 20 nM-os koncentrációk mellett rögzítettük.

6.1.6. Egyedi antitestek fluoreszcencia intenzitás eloszlása a törzsoldatban és a sejthez kötött frakcióban

Az összes előző kísérletes és elméleti eredményünk arra enged következtetni, hogy a sejthez kötött antitestek jelölési aránya alacsonyabb, mint a jelölésre használt antitest oldatoké, mivel a többszörösen jelölt antitestek alacsony affinitásuk miatt alulreprezentáltak a kötött frakcióban. Annak érdekében, hogy még jobban megbizonyosodhassunk arról, hogy a fenti következtetések helyesek, egyedi molekula méréseket végeztünk AlexaFluor546-tal és AlexaFluor647-tel jelölt antitest törzsoldatokkal, illetve azok sejthez kötött frakcióival. Kellően hígított antitest oldatokat immobilizáltunk epoxival kezelt fedőlemezen azért, hogy egy detektált fluoreszcencia folt valóban egyetlen antitesttől származzon. Ugyanebből az okból a sejteket is kellően híg antitest oldatokkal jelöltük meg, és mindkét típusú minta esetében a

fedőlemezhez közeli síkról vettünk fel képeket. A háttér („sötét IgG”) meghatározásához fedőlemezhez-, illetve sejthez kötött AlexaFluor488 festéket használtunk. Az AlexaFluor488 jel segítségével megkerestük a fedőlemezhez közeli síkot, majd a képeket az AlexaFluor546 vagy AlexaFluor647 csatornában rögzítettük. Az AlexaFluor488-cal jelölt minták azért használhatóak negatív kontrollként, mert az AlexaFluor488 átvilágítása elhanyagolható az AlexaFluor546 és AlexaFluor647 csatornába. Ezek a mérések bizonyították továbbá, hogy az AlexaFluor546- és AlexaFluor647-konjugált antitestek jele erősebb, mint az autofluoreszcencia (15. ábra).

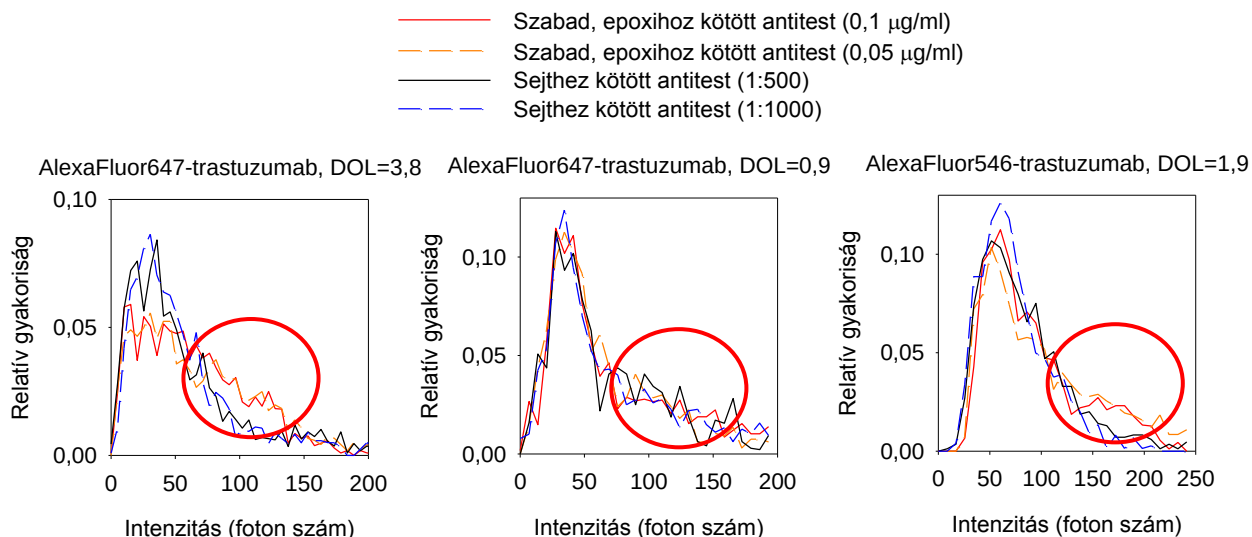


15. ábra: Reprezentatív egyedi molekula fluoreszcenciás képek. AlexaFluor546-tal vagy AlexaFluor647-tel jelölt trastuzumab antitesteket epoxival kezelt fedőlemezhez rögzítettünk, illetve SKBR-3 sejteket jelöltünk velük. A fedőlemezhez és sejthez kötött antitestekről képeket vettünk fel fotonszámláló módban (Fluoreszcens IgG). A háttér meghatározásához („Sötét IgG”) a fedőlemezt és a sejteket AlexaFluor488-konjugált antitestekkel jelöltük, hogy megtaláljuk a minta fedőlemezhez közeli rétegét. Miután megtaláltuk a megfelelő réteget, képet készítettünk AlexaFluor546-nak és AlexaFluor647-nek megfelelő beállítások mellett.

Megvizsgáltuk a fluoreszcens foltok intenzitáseloszlását a törzsoldtatok és a sejthez kötött frakció esetében is, melyhez nagy jelölési arányú (DOL=3,8) AlexaFluor647-trastuzumab antitestet használtunk. Az ilyen magas F/P-jű antitest oldatoknál azt várjuk, hogy számos, 3-4 fluorofórral konjugált antitestet tartalmaz, és a benne lévő antitest specieszek

eloszlása Poisson eloszlást követ. Meglepő módon a törzsoldat vizsgálatokor az alacsony intenzitással rendelkező foltok fordultak elő a leggyakrabban, ami ellentétes a Poisson eloszlással (16. ábra). Ezt a jelenséget a magas jelölési arány és a kvantumhatékonyság közötti fordított arányosságnak tulajdonítottuk. Az antitestek átlagos intenzitását minden egyes folt fotonszámából számoltuk ki, ami 3,8 F/P-jű antitest esetében csak ~25%-kal volt magasabb, mint a 0,9 DOL-lal rendelkező antitest intenzitása, ami összhangban volt a 8. ábrán bemutatott eredményekkel. Az antitest törzsoldatok és a sejthez kötött antitestek intenzitáseloszlásának összehasonlításakor azt tapasztaltuk, hogy egy magasabb jelölési aránnyal (DOL=3,8) rendelkező AlexaFluor647-trastuzumab esetén a magas DOL-lal rendelkező molekula specieszek egyértelműen alulreprezentáltak a sejthez kötött frakcióban. AlexaFluor647-trastuzumab egy alacsonyabb jelölési arányú (DOL=0,9) antitest oldatát vizsgálva nem találtunk jelentős különbséget a kötött antitestek és a törzsoldat intenzitáseloszlásában (16. ábra). Tulajdonképpen, amikor megfigyeltük az AlexaFluor647-trastuzumab kötött frakciójának intenzitáseloszlását 3,8-as DOL, illetve 0,9-es DOL esetén, azt láttuk, hogy a görbék tulajdonképpen azonosak voltak. Mindezek a megállapítások megegyeznek a 11. ábra következtetéseivel. Megvizsgáltuk az AlexaFluor546-jelölt trastuzumab-ot (DOL=1,9) is, ahol szintén azt tapasztaltuk a magas DOL-lal rendelkező egyedi molekulák kevésbé voltak jelen a sejthez kötött frakcióban, habár ez a hatás nem volt akkora mértékű, mint a nagy F/P-jű AlexaFluor647-trastuzumab estében, ami szintén egybevág a 11. ábrával. Ezek az eredmények összhangban vannak az előző fejezetben bemutatott eredményekkel is (8. és 11. ábrák).

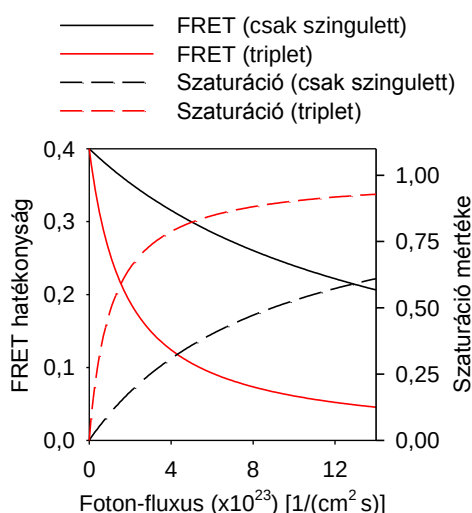
Levonható az a következtetés, hogy az egyedi molekula mérések megerősítik az áramlási citometriás és fluoriméteres intenzitás, illetve anizotrópiás kísérletek eredményeit, melyek szerint egy antitest törzsoldaton belül az alacsonyabb jelölési aránnyal rendelkező antitestek a legtöbb esetben jobban kötődnek antigénjeikhez.



16. ábra: Szabad és sejthez kötött antitestek egyedi molekula mérései. A sejteket az ábrán feltüntetett jelölt és jelöletlen antitestek (1:500 és 1:1000) keverékével jelöltük azért, hogy a jelölt, membránkötött antitestek számát olyan mértékben csökkentsük, hogy egy diffrakció limitált fluoreszcens folt valóban egyetlen antitestnek feleljen meg. Antitest törzsoldatokat két különböző koncentrációban (0,1 $\mu\text{g/ml}$ és 0,05 $\mu\text{g/ml}$) immobilizáltunk epoxival kezelt fedőlemezek felszínén. Mind a sejthez kötött, mind az epoxival bevont fedőlemezhez kovalensen kikötött antitestekről ugyanolyan feltételek mellett képeket készítettünk. A fedőlemez felszínéhez lehető legközelebb eső síkban képeket készítettünk foton számláló módban, és megvizsgáltuk a fluoreszcens foltok intenzitását. A piros körök jelzik a különböző jelölési arányú szabad és sejthez kötött antitestek gyakoriságának különbségét magasabb intenzitás esetén.

6.2. A fluorofór szaturáció hátrányos hatásainak csökkentése FRET mikroszkópia során

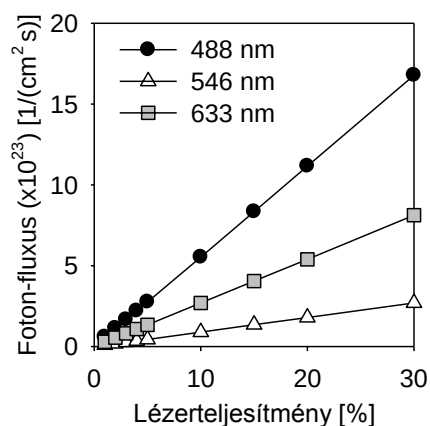
Magas gerjesztési foton-fluxus esetén elméleti megfontolások miatt csökken a FRET indukálta donor fluoreszcencia kioltás, mert ilyenkor az energiatranszfer által relaxálódott donor szinte azonnal újra gerjesztett állapotba kerül (17. ábra).



17. ábra: A donor szaturáció jelensége és hatása a FRET hatékonyságra. Meghatároztuk a fluorofór szaturáció mértékét a foton-fluxus függvényében triplet állapot jelenlétében és hiányában egyaránt (szaggatott vonalak, $\tau=4,1$ ns, $\epsilon=73000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $k_{\text{isc}}=7,3 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{ph}}=10^6 \text{ s}^{-1}$). A fluoreszcencia élettartam és a moláris abszorpciós együttható megegyezik az AlexaFluor488 értékeivel, míg a sebességi állandókat úgy választottuk meg, hogy 1 μs -os triplet élettartamnak és 0,03 triplet kvantumhatásfoknak feleljenek meg. Feltételeztük, hogy ez a fluorofór donorként funkcionál FRET során, melynek transzferhatékonysága 0,4. Modelleztük ezt a rendszert triplet állapot jelenlétében és hiányában egyaránt, ami során a FRET hatékonyságot a szaturációt figyelmen kívül hagyó hagyományos képlet alapján számoltuk ki (folytonos vonalak).

A jelenség kvantitatív átgondolását már az elmélet című fejezetben ismerttettem, ami megjósolja, hogy a donor kioltásából számolt FRET hatékonyság ($E_{\text{látszólagos}}$, l. „Elmélet” 42. egyenlet) csökken a szaturálódott donorok függvényében (D_{sat} , l. „Elmélet” 38. egyenlet). A 42. egyenlet átrendezése lehetőséget nyújt arra, hogy a FRET hatékonyságot donor szaturációra korrigáljuk (l. „Elmélet” 43. egyenlet).

Mivel a konfokális mikroszkópiában általánosan használt gerjesztő foton-fluxus gyakran esik olyan tartományba, ahol a szaturáció jelensége jelen van (18. ábra) úgy véltük, hogy ezt a problémát érdemes tovább vizsgálni.



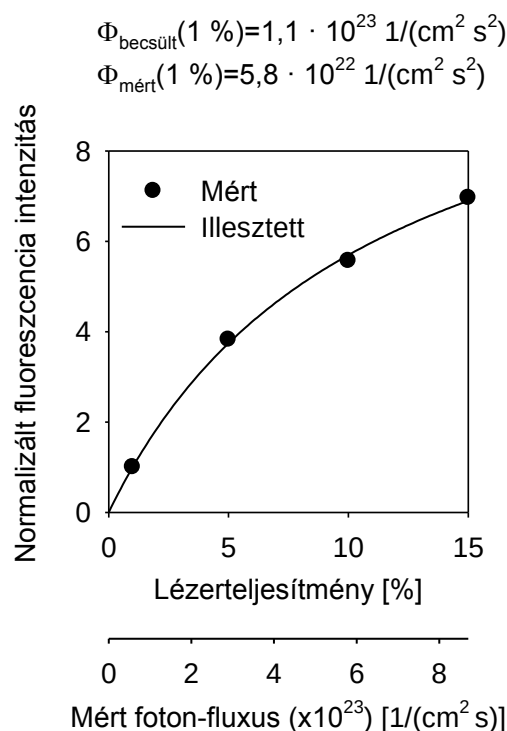
18. ábra: Foton-fluxus mérése. Az x tengelyen három különböző lézervonal intenzitásának mikroszkópon használt százalékos skálán történő beállítása látható. A valós teljesítményt megmértük a fókusz síkban és átalakítottuk foton-fluxussá.

A korábban említett 42. egyenlet megjelöli az $E_{\text{látszólagos}}$ gerjesztő foton-fluxustól függő hanyatlását kisebb, illetve nagyobb elméleti FRET értékek esetében is (6. ábra).

A fluorofór szaturációt a tiltott átmenet jelentősen befolyásolja, mivel a festék populációk akár 50-80%-a is felhalmozódhat triplet állapotban [99], ami a látszólagos FRET hatékonyságra is hatással lehet. Az elméleti részben leírtak szerint a donorkioltásból származó látszólagos FRET hatékonyság a szaturálódott donorok arányával csökken, még akkor is, ha triplet állapotban halmozódnak fel (l. „Elmélet” 48. és 53. egyenlet).

Az 53. egyenlet alapján két fontos következtetést vonhatunk le: (i) nem a gerjesztett állapotban lévő donorok, hanem az S1 állapot normalizált, szaturálódott hányada határozza meg a donor kioltás alapján számolt FRET hatékonyság csökkenését. (ii) Ha a gerjesztett molekulák triplet állapotban felhalmozódnak, akkor a FRET hatékonyság látszólagos hanyatlása még nagyobb mértékű lesz (17. ábra). A fentebb említett megfigyelések lehetővé teszik azt, hogy korrigáljuk a látszólagos FRET hatékonyságot a donor szaturációra. De kísérletes munkák előtt még két problémát számításba kell vennünk. (i) A donor szaturációt és a FRET frusztrációt is figyelembe vevő egyenletrendszer expliciten tartalmazza a foton-fluxust. (ii) A fluorofór szaturáció pontos jóslásához szükséges k_{isc} és k_{ph} paramétereket nehéz kísérletesen meghatározni. A foton-fluxus meghatározását nem lézerintenzitás-mérővel

hajtottuk végre, hanem a különböző gerjesztési foton-fluxusok mellett mért fluoreszcencia intenzitásokra illesztettük a 54. egyenletet, amiből megkaptuk a foton-fluxust (20. ábra).



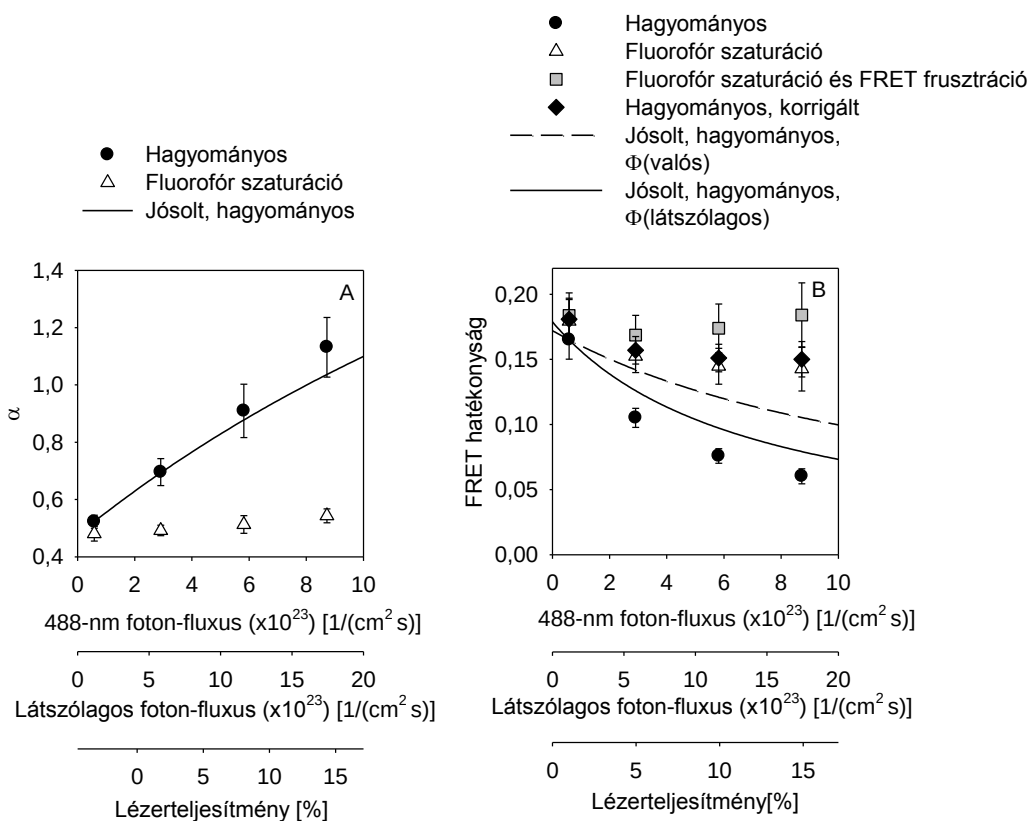
19. ábra: A látszólagos foton-fluxus meghatározása fluorofór szaturációból. AlexaFluor488 festék 50 nM-os oldatának megmértük a fluoreszcencia intenzitását a fedőlemez aljához lehető legközelebb négy különböző lézerteljesítmény mellett, ami 1%, 5%, 10% és 15%-os mikroszkóp beállításhoz felel meg. A fluoreszcencia intenzitásokat az 1%-on mért fluoreszcencia intenzitáshoz normalizáltuk és a normalizált értékekre az 54. egyenletet illesztettük. Az illesztéssel megadható a becsült foton-fluxus ($\Phi_{\text{becsült}}$), ami megközelítőleg kétszer nagyobb a valós, mért foton-fluxusnál ($\Phi_{\text{valós}}$) AlexaFluor488 esetében. A valós foton-fluxus az ábrán középen, fent látható. A vízszintes skála a lézerteljesítményt mutatja mind a mikroszkópon állítható százalékos skálán, mind az optikai teljesítménymérővel mért valós foton-fluxus skálán ($n=3$).

Ha a triplet állapotban felhalmozódik a festék, az ebből az illesztésből származó foton-fluxus ($\Phi_{\text{látszólagos}}$) túlbecsüli a valós foton-fluxust (l. „Elmélet” 55. egyenlet). Ha a triplet állapot jelen van a festékeknél, de olyan modellt alkalmazunk a FRET hatékonyság látszólagos csökkenésének jóslására, ami figyelmen kívül hagyja ezt a triplet állapotot (l. „Elmélet” 43. egyenlet), akkor a FRET hatékonyság látszólagos csökkenésének pontos becslését kapjuk, ha nem a valós, hanem a látszólagos foton-fluxust használjuk (l. „Elmélet” 56. egyenlet). Következésképpen, az általunk javasolt módszer csak a látszólagos foton-fluxus meghatározását igényli, mely könnyen meghatározható a fluorofór szaturációból

ahelyett, hogy bonyolult méréseket végeznénk az $S1 \rightarrow T1$ átmenet sebességi állandójának meghatározására.

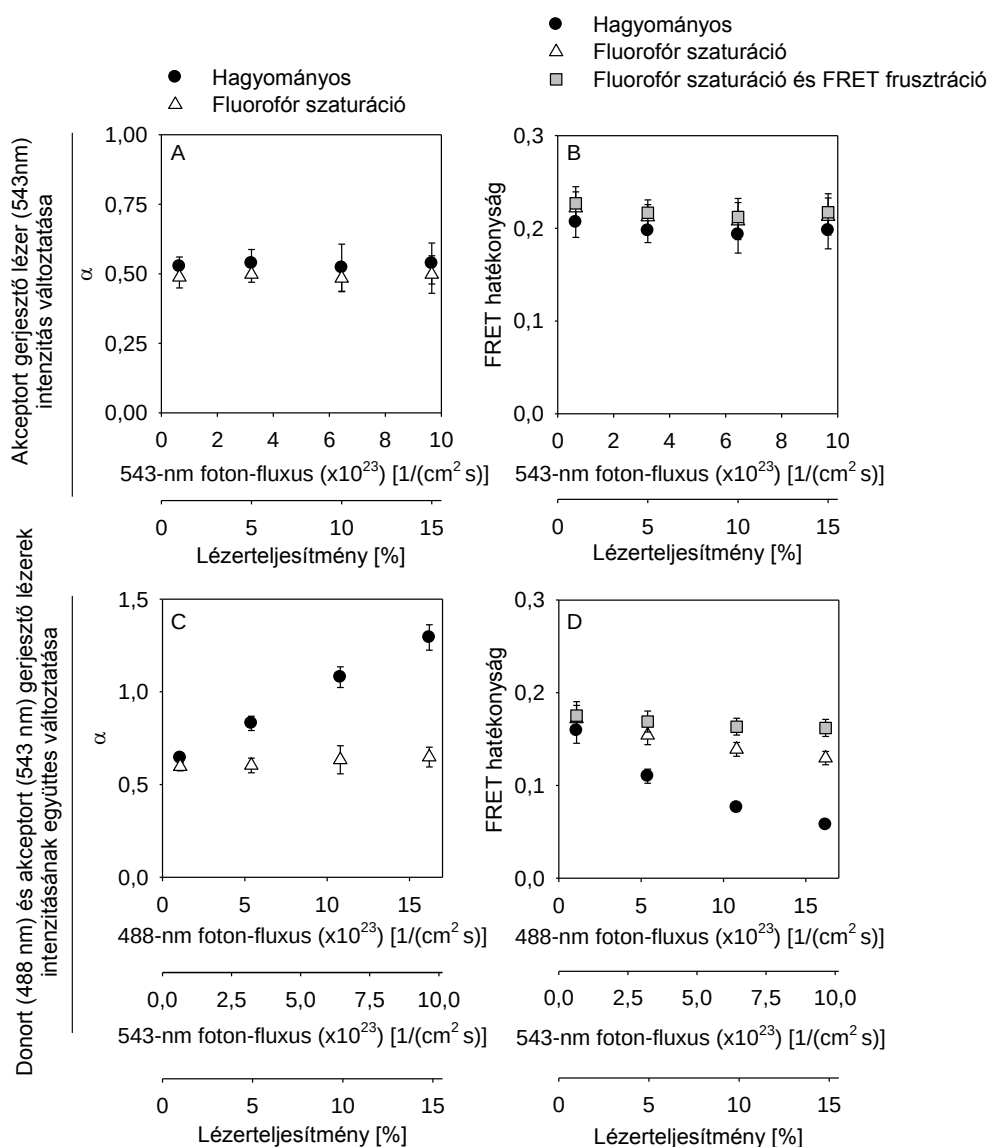
Az „Elmélet” fejezetben bemutattam a fluorofórszaturációt figyelembe vevő egyenletrendszert (62. egyenlet), amely megszünteti az intenzitásalapú FRET hatékonyság foton-fluxustól való függését. A FRET hatékonyság intenzitásalapú meghatározásához szükséges az α paraméter meghatározása, ami a gerjesztett állapotú akceptorok detektálhatóságát viszonyítja a gerjesztett donorok detektálhatóságához. Az α faktor gerjesztő foton-fluxusra történő korrekcióját és a spektrális korrekciós faktorok levezetését az „Elmélet” részben részletesen kifejtettem. Az eredmények részben eddig tárgyalt egyenletek nem vették figyelembe a FRET frusztráció jelenségét, mely akkor jön létre, amikor az akceptor gerjesztett állapotban van, és emiatt a donor nem tud FRET által relaxálódni. Egy másik egyenletrendszert is létrehoztunk, mely figyelembe veszi a fluorofór szaturációt és a FRET frusztrációt egyaránt (részleteiben l. „Elmélet” 69. egyenlet).

AlexaFluor488-AlexaFluor546 donor-akceptor pár esetében a FRET értékek meghatározására a fentiekben említett alapelveket alkalmaztuk. Várakozásainknak megfelelően a FRET hatékonyság csökken, még az α értéke meredeken nő a donort gerjesztő lézerintenzitás növelésével (20. ábra). Az α faktor fluorofór szaturációra történő korrigálását követően függetlenné vált a foton-fluxustól. A FRET hatékonyságot három különböző módon korrigáltuk: (i) a hagyományos egyenletet korrigáltuk a 43. egyenlet szerint, (ii) a fluorofór szaturációval számoló, de FRET frusztrációt mellőző, (iii) fluorofór szaturációt és FRET frusztrációt egyaránt figyelembe vevő egyenleteket használva. Az első két esetben megegyező eredményeket kaptunk, a FRET hatékonyság kevésbé függött a foton-fluxustól. A harmadik korrekciós módszer szinte teljesen megszünteti a FRET hatásfok gerjesztő foton-fluxustól való függését.



20. ábra: FRET és α értékek AlexaFluor488-AlexaFluor546 donor-akceptor pár esetében. (A) SKBR-3 sejteket AlexaFluor488-trastuzumab vagy AlexaFluor546-trastuzumab antitestekkel jelöltünk, és mind a donorral, mind az akceptorral jelölt minta fluoreszcencia intenzitását a donor, illetve a FRET csatornában megmértük 488 nm-es lézer változó intenzitásai mellett. Az α értékeit mind a hagyományos, fluorofór szaturációt mellőző (l. „Elmélet” 58. egyenlet), mind a javasolt, szaturációt figyelembe vevő képletekkel meghatároztuk (l. „Elmélet” 59. egyenlet). A folytonos vonal mutatja a konvencionális módon számolt, α értékeket a gerjesztő fény intenzitásának függvényében (l. „Elmélet” 61. egyenlet). A valós foton-fluxus, a látszólagos foton-fluxus és a százalékos skálán mért intenzitás a vízszintes tengelyeken látható mindkét ábra esetében. (B) A sejteket AlexaFluor488-trastuzumab, illetve AlexaFluor546-pertuzumab antitestekkel együttesen jelöltük, majd a fluoreszcencia intenzitásokat a donor, FRET és akceptor csatornában megmértük a 488 nm-es lézer változó intenzitásai mellett. A FRET értékeket négy különböző módon határoztuk meg: hagyományos, fluorofór szaturációt mellőző (●), donor szaturációt figyelembe vevő (△), donor szaturációt és FRET frusztrációval egyaránt számoló modellel (■), és a hagyományos képlet donor szaturációra korrigált (◆) (l. „Elmélet” 43. egyenlet) változatával. A szaggatott és folytonos vonalak mutatják a hagyományos képlettel számolt FRET hatékonyság várt változását a valós és látszólagos foton-fluxus függvényében az elméleti rész 42. egyenlete szerint. Az akceptort gerjesztő foton-fluxus 543 nm-es lézer esetében $9,5 \cdot 10^{21} 1/(\text{cm}^2 \text{s})$ volt, ami 1%-os lézerintenzitásnak felel meg. Az ábrákon három mérés átlaga látható, és a hibajelek a SEM értékeket mutatják.

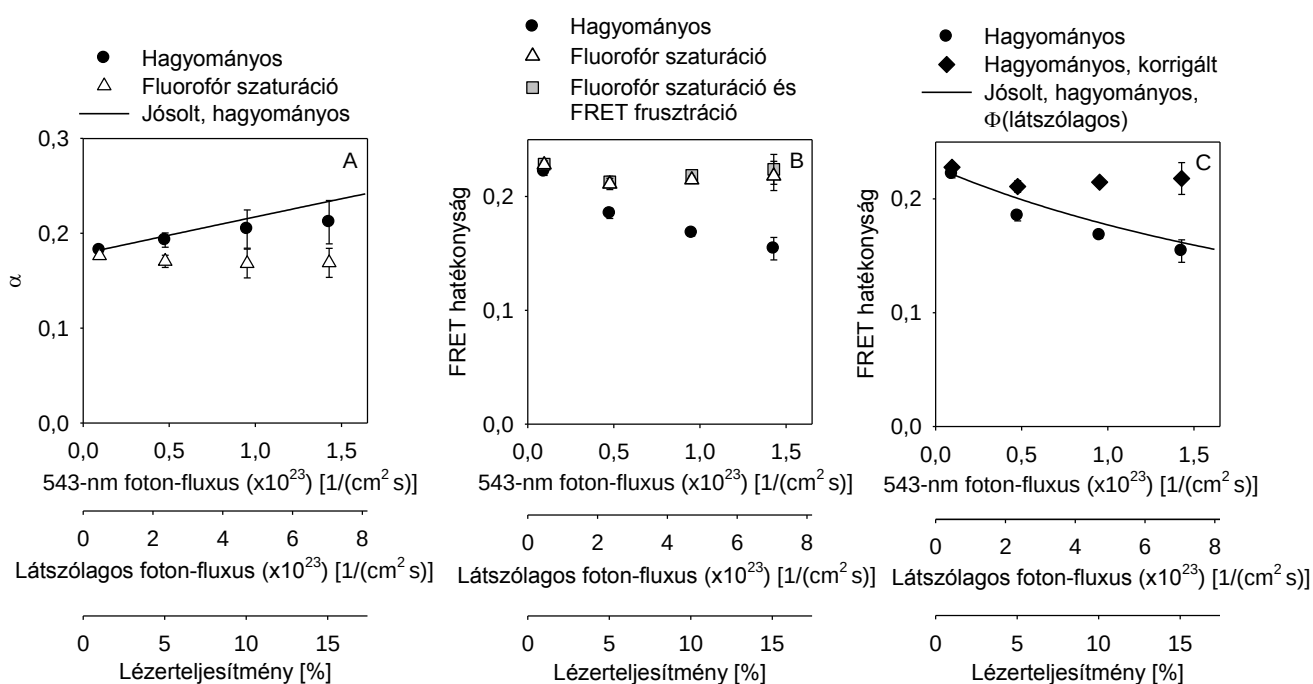
Megvizsgáltuk, hogy a FRET értékek hogyan változnak, ha csak a donor-, csak az akceptor-, vagy mindkét gerjesztő lézer intenzitást változtatjuk, és eredményeinkből az derül ki, hogy a donort gerjesztő foton-fluxus számít a leginkább (21. ábra).



21. ábra: Az α faktor és a látszólagos FRET hatékonyság változása a donort és az akceptort gerjesztő lézerintenzitás függvényében. (A) SKBR-3 sejteket AlexaFluor488-trastuzumabbal vagy AlexaFluor546-trastuzumabbal jelöltünk, és mindkettő intenzitását megmértük a donor, illetve FRET csatornában 543 nm-es lézer változó lézerintenzitásai mellett, míg a 488 nm-es lézert állandó $5,8 \cdot 10^{22} \text{ 1/(cm}^2 \text{ s)}$ értéken tartottuk, ami a mikroszkóp 1%-os beállításának felelt meg. Az α értékeit mind a hagyományos fluorofór szaturációt mellőző (l. „Elmélet” 58. egyenlet), mind az új, szaturációt figyelembe vevő képletekkel meghatároztuk (l. „Elmélet” 59. egyenlet). (B) A sejteket egyaránt megjelöltük AlexaFluor488-trastuzumab és

AlexaFluor546-pertuzumab antitestekkel, majd megmértük az intenzitásokat a donor, FRET és akceptor csatornában, miközben az 543 nm-es lézer intenzitását változtattuk, míg a 488 nm-es lézert fix $5,8 \cdot 10^{22} \text{ 1/(cm}^2 \text{ s)}$ értéken tartottuk, ami a mikroszkóp 1%-os beállításának felelt meg. A FRET értékeket három különböző módon határoztuk meg: hagyományos, fluorofór szaturációtól eltekintő (●), szaturációt figyelembe vevő (△), és a szaturációval és FRET frusztrációval egyaránt számoló (■) egyenletek segítségével. (C-D) Az A és B ábrán szereplő mintákat megmértük olyan körülmények között is, amikor a 488 nm-es és 543 nm-es lézerintenzitásokat egyszerre változtattuk, ezt az x tengely mutatja. Az ábrákon három mérés átlaga látható, és a hibajelek a SEM értékeket mutatják.

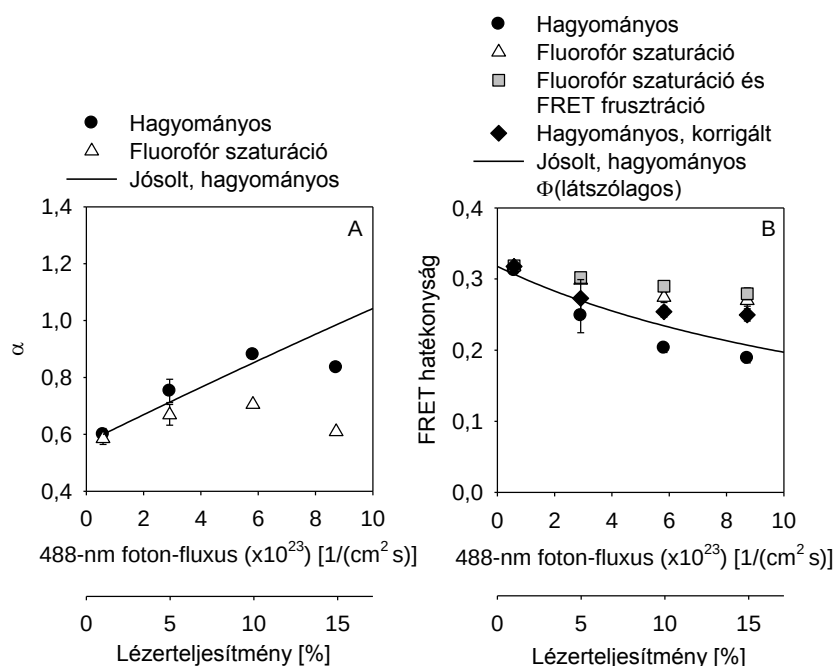
Méréseinket szintén kiviteleztek más donor-akceptor párral is (AlexaFluor546-AlexaFluor647), melyek ugyanezt az eredményt mutatták (22. ábra).



22. ábra: FRET értékek AlexaFluor546-AlexaFluor647 donor-akceptor pár esetén. (A) SKBR-3 sejteket AlexaFluor546-trastuzumab vagy AlexaFluor647-trastuzumab antitestekkel jelöltünk, és mind a donorral, mind az akceptorral jelölt minták intenzitásait megmértük a donor, illetve FRET csatornában az 543 nm-es lézer változó intenzitásai mellett. Az α értékeit meghatároztuk a hagyományos képlettel, (l. 58. egyenlet) és a szaturációt számításba vevő képlettel (l. 59. egyenlet). A folytonos vonal mutatja a hagyományos képlettel számolt, α értékeket a lézerintenzitás függvényében (l. 61. egyenlet). A valós foton-fluxus, a látszólagos foton-fluxus és a százalékos skálán mért intenzitás a vízszintes tengelyeken

látható minden ábra esetén. (B-C) A sejteket AlexaFluor546-trastuzumab és AlexaFluor647-pertuzumab antitestekkel jelöltük, és intenzitásukat lementük a donor, FRET és akceptor csatornában egyaránt 543 nm-es lézer különböző intenzitásai mellett. A FRET értékeket négy különböző módon határoztuk meg: hagyományos, fluorofór szaturációt mellőző (●), donor szaturációt figyelembe vevő (△), donor szaturációval és FRET frusztrációval egyaránt számoló (■) módokon, valamint a hagyományos képlet donor szaturációra korrigált (◆) (l. „Elmélet” 43. egyenlet) változatával. Az akceptort gerjesztő lézer intenzitása folyamatosan 1% volt ami $2,9 \cdot 10^{22} \text{ 1/(cm}^2 \text{ s)}$ -os foton-fluxusnak felel meg. Az ábrákon három mérés átlaga látható, és a hibajelek a SEM értékeket mutatják.

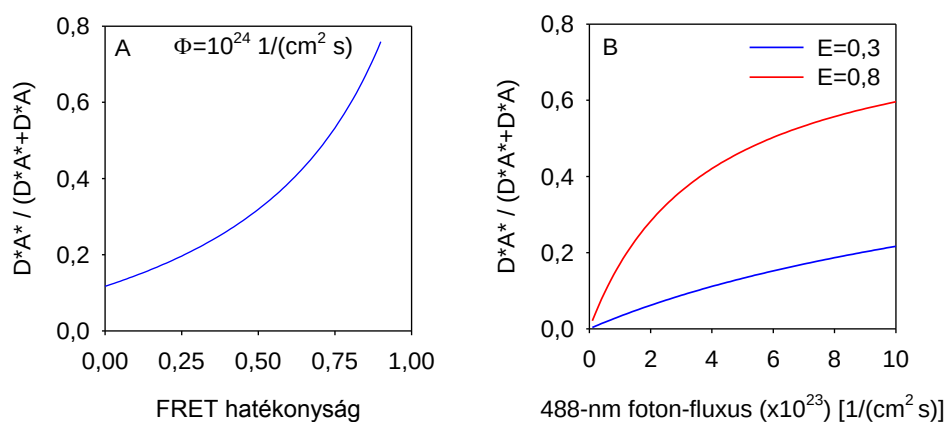
A módszereinket kipróbáltuk fluoreszcens proteinek által alkotott donor-akceptor (GFP + mCherry) pár esetében is. Az egyenletrendszer kicsit módosítottuk azért, hogy az α és FRET értékeket ugyanabból a mérésből meghatározassuk [24] (l. „Elmélet”). Ezek a mérések szintén megerősítették azt, hogy a fluorofór szaturációt figyelembe vevő egyenlet alkalmazása sikeresen megszünteti a FRET hatékonyság függését a gerjesztési foton-fluxustól (23. ábra). Itt érdemes kiemelni, hogy GFP esetén a becsült, illetve a valós foton-fluxus azonos volt, ami annak köszönhető, hogy a GFP nagyon kis valószínűséggel kerül triplet állapotba [100].



23. ábra. Az α és a FRET értékek változása az mCherry-GFP donor-akceptor rendszerben a gerjesztő lézerintenzitás függvényében. (A) A sejteket mCherry-GFP-s fúziós plazmiddal transzfektáltuk, így a sejtek olyan fehérjéket termeltek, amik együttesen kifejezik mind a két fehérjét. A fluoreszcencia intenzitásokat megmértük a 488 nm-es lézer változó intenzitásai mellett, és az α értéket az 58. egyenlet (szaturációt mellőző) és

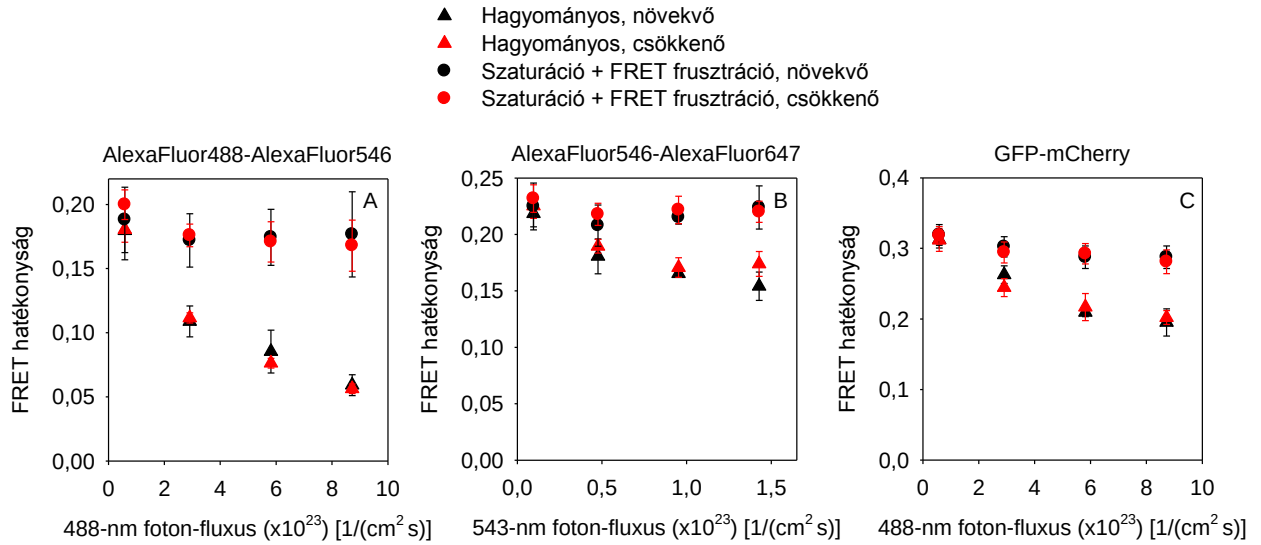
59. egyenlet (szaturációval számoló) szerint határoztuk meg. A folytonos vonal a hagyományos módszerrel számol, jóslott α értékek várt függését mutatja a foton-fluxustól (l. 61. egyenlet). A valós foton-fluxus és a mikroszkópon állítható, százalékos intenzitás a vízszintes tengelyen van feltüntetve az ábra mindkét részén. A látszólagos foton-fluxust nem tüntettem fel, mivel az azonos a valós foton-fluxussal. (B) Az mCherry-GFP konstrukttal transzfektált sejtek fluoreszcencia intenzitását megmértük a donor, FRET és akceptor csatornában a 488 nm-es lézer változó intenzitásai mellett. A FRET értékeit négy különböző módon határoztuk meg: hagyományos, fluorofór szaturációt mellőző (●), donor szaturációt figyelembe vevő (△), donor szaturációt és FRET frusztrációt egyaránt számoló (■) egyenletekkel, valamint a hagyományos képlet donor szaturációra korrigált (◆) (l. „Elmélet” 43. egyenlet) változatával. A folytonos vonal mutatja a hagyományos képlettel számolt FRET hatékonyság várt csökkenését a gerjesztő fény intenzitásának függvényében a 42. egyenlet szerint. Az akceptort gerjesztő, 543 nm-es lézer foton-fluxusát $9,5 \cdot 10^{21} \text{ 1/(cm}^2 \text{ s)}$ -en tartottuk, ami a mikroszkóp 1%-os beállításának felel meg. Az ábrákon három mérés átlaga látható, és a hibajelek a SEM értékeket mutatják.

A fent említett módszerek érvényességét és alkalmazhatóságát megerősíti az, hogy sikerült a számolt FRET értékeket a megvilágító foton-fluxustól függetleníteni. Egy fluorofórnak számos deexcitációs útvonala létezik, melyek közül a fotoelhalványítás és a szingulett-szingulett annihiláció befolyásolja a FRET számításokat [25], [101]. A modell kidolgozása során egyiket sem vettük figyelembe a következő okok miatt. A szingulett-szingulett annihiláció előfordulása nem valószínű az általunk felállított kísérletes rendszerben, mivel: (i) bemutattuk, hogy a látszólagos FRET hatékonyságot függetlenítettük a megvilágító lézer teljesítményétől. Már maga ez az alapjelenség, a foton-fluxustól függő FRET hatékonyság csökkenése arra utal, hogy a szingulett-szingulett annihiláció nincs jelen a vizsgált kísérleti rendszerünkben [101]. (ii) Egy donort és egy akceptort tartalmazó komplexben szingulett-szingulett annihiláció akkor történik, amikor mind a két fluorofór gerjesztett állapotban van (D^*A^*). Azoknak a komplexeknek a hányadát, ahol a donor gerjesztett állapotban van ($D^*A + D^*A^*$) az elmélet 67. egyenlete írja le. Ezek a számítások azt a következtést engedik levonni, hogy csak a magas FRET értékeknél fordulnak elő a D^*A^* komplexek jelentős mértékben (24. ábra). Mivel sejtes FRET mérések esetében a FRET értékek ritkán magasabbak 0,3-0,4-nél, ezért a szingulett-szingulett annihiláció figyelmen kívül hagyása ésszerű feltételezés az ilyen jellegű kísérletek során.



24. ábra: Gerjesztett donor és gerjesztett akceptor molekulák komplexeinek csekély jelenléte alacsony FRET hatékonyság esetében. 488 nm-en gerjesztett AlexaFluor488 és AlexaFluor546 komplexét modelleztünk a 67. egyenlet szerint. A függőleges tengelyen a D^*A^* aránya látható az összes olyan komplexhez viszonyítva, ahol a donorok gerjesztett állapotban vannak ($D^*A^* + D^*A$). A D^*A^* jelenléte erősen függ a FRET hatékonyságtól állandó foton-fluxus mellett (A). A D^*A^* gerjesztő intenzitástól függő felhalmozódását két különböző FRET érték esetében is vizsgáltuk, és látható, hogy ezen duplán gerjesztett komplexek jelenléte elhanyagolható alacsony FRET hatékonyság esetében (B).

A fotoelhalványítás szintén egy olyan jelenség, ami befolyásolni képes a FRET méréseket azáltal, hogy csökkenti a donorok és akceptorok mennyiségét és sűrűségét, illetve megváltoztatja a donorok és akceptorok egymáshoz viszonyított arányát [25]. Attól függően, hogy a donorok és akceptorok véletlenszerűen oszlanak el, vagy klaszterekbe rendeződve találhatók meg, illetve mekkora a klaszter mérete, a fotoelhalványítás okozta FRET hatékonyság változás mértéke eltérő lehet [95], [102]–[104]. Bár az általunk vizsgált három kísérleti rendszerben a festékek intenzitása ~30%-kal csökkent a kísérlet során a fotoelhalványítás miatt, ez a jelenség a számolt FRET hatékonyságra nem gyakorolt jelentős hatást. Ezt a 25. ábra bizonyítja, hiszen a FRET értékekre nem volt hatással a gerjesztő fénnel történő előző megvilágítás időtartama. Ha hagyományos vagy bármelyik fent említett módszerrel meghatározott FRET értékekről kiderült volna, hogy érzékenyek a fotoelhalványításra, akkor az egyenletek erre a jelenségre történő korrekciója is szükséges lenne.



25. ábra: A fotoelhalványítás indukált FRET torzítás hiánya három különböző mérés esetén. A dolgozatban említett három különböző donor-akceptor pár esetén meghatároztuk a FRET értékeket hagyományos (háromszögek), illetve fluorofór szaturációra és FRET frusztrációra korrigált (körök) egyenletekkel. A kísérletet négy különböző donor gerjesztési intenzitás mellett végeztük, miközben az akceptor lézer intenzitását fixen tartottuk. A méréseket két módon végeztük. A gerjesztést folyamatosan növeltük egy kép estében (fekete szimbólumok), míg egy másik területről készült képek esetében fokozatosan csökkenő gerjesztő intenzitás mellett vettünk fel képeket (piros alakzatok). Az ábrákon három mérés átlaga látható, és a hibajelek a SEM értékeket mutatják.

7. Eredmények megbeszélése

7.1. Az antitest jelölés hatása az antitestek és a fluorofórok tulajdonságaira

Korábbi eredmények már beszámoltak arról, hogy az antitestek fluorofórokkal történő konjugációja negatívan befolyásolja az antitestek affinitását [47], [50], [51], illetve azt is kijelentették, hogy az antitestekhez kötött fluorofórok kvantumhatékonysága alacsonyabb, mint a szabad fluorofóroké [105], [106]. Annak ellenére, hogy sok vizsgálati módszerhez szükséges a kötött antitestek jelölési arányának ismerete, mégsem végeztek kvantitatív modell számításokat vagy méréseket ennek kiderítésére.

Az antitestek affinitásával és kvantumhatékonyságával foglalkozó témában bemutatott kísérletes eredményeink fő megállapításai a következők: (i) az antitesthez konjugált fluorofórok csökkent kvantumhatékonyságot mutatnak, amiben mind a dinamikus, mind a statikus kioltás szerepet játszik. Fluoreszcencia élettartam méréseink alapján a statikus kioltás dominál. (ii) Csökken az antitestek epitóp iránti affinitása a jelölési arány növelésével, ami az antitest törzsoldatnál kisebb DOL-lal rendelkező antitestek preferenciális kötődését eredményezi. (iii) Modellszámításaink és kísérleti eredményeink alapján a különböző festékekkel történő jelölés más-más módon hat az antitestek affinitására és kvantumhatékonyságára, amit az AlexaFluor647-tel, illetve AlexaFluor546-tal végzett vizsgálataink bizonyítottak.

Megállapítottuk, hogy a többszörösen jelölt antitestek esetében a fluoreszcencia kioltásban főleg a statikus quenching dominál, de a dinamikus hatások is érvényesülnek. Az önkioltás során fontos szerepet játszik a festék aggregátumok kialakulása, illetve olyan FRET folyamatok, melyek során az energia nem-fluoreszcens klaszterekre vagy dimerekre tevődik át. Az abszorpciós és gerjesztési spektrumok összehasonlításának köszönhetően kiderült, hogy ezek a nem-fluoreszcens aggregátumok jelen vannak mindkét AlexaFluor festéknél. Egy IgG-n körülbelül 90 potenciális lizin oldallánc található, lehetőséget teremtve ezzel a konjugált festékek aggregálódására. A H-aggregátumok olyan alapállapotú, nem-fluoreszcens klaszterek, melyek statikus kioltás segítségével fluoreszcencia intenzitás csökkenéshez vezetne, úgy, hogy a fluoreszcencia élettartamot nem változtatják [96]. Ellenben a nem aggregált festékmonomerek FRET általi relaxációja nem-fluoreszcens dimerek segítségével dinamikus kioltást eredményez, ami az élettartam csökkenésében fog megnyilvánulni. Mivel ezek a nem-fluoreszcens aggregátumok nem játszanak szerepet a fluoreszcencia emisszióban, és a homo-FRET-nek sem képezik részét (mivel a festék monomer és a nem-fluoreszcens

dimer spektroszkópiailag eltér egymástól), ezért a klasztermérettől függő anizotrópia várhatóan eltér a Runnels-Scarlati elméletében megjósoltaktól [88].

Három különböző kísérletünk bizonyítja, hogy a többszörösen jelölt antitestek alulreprezentáltak a sejthez kötött antitestfrakcióban: (i) Összehasonlítottuk az antitest törzsoldat és a sejthez kötött antitestek fluoreszcencia intenzitásait a jelölési arány függvényében. (ii) Összehasonlítottuk az antitest törzsoldatok és azok kötött frakcióinak anizotrópiáját. (iii) Közvetlenül megmértük a kötött frakcióban és az antitest törzsoldatban lévő egyedi antitest molekulák intenzitáseloszlását. A kötött frakció anizotrópiájának jóslására olyan modellszámításokat végeztünk, ami megállapította, hogy az antitest törzsoldatok DOL függvényében mért anizotrópiájára illesztett görbe kalibrációs görbeként használható a kötött frakció jelölési arányának meghatározására. Az antitest csökkent affinitását a molekula konjugáció hatására megváltozó vagy gátolt belső flexibilitása magyarázhatja [107], [108]. Habár az antitestek és a fluorofórok a fluoreszcencia jelöléssel szembeni érzékenységekben jelentős különbségeket mutatnak, a kötött frakció átlagos jelölési aránya szinte mindig alacsonyabb, mint a sejtek jelölésére használt antitest törzsoldatok F/P-je. Mérési alternatívaként felmerült, hogy közvetlenül határozzuk meg a kötött antitestek DOL értékét, ugyanolyan módon, mint az antitest oldatok esetében. Ez az egyszerű módszer azonban nem bizonyult megvalósíthatónak, mivel a kötött antitest abszorpciója mérhetetlenül alacsonynak bizonyult. Elméletünk szerint a jelölést követően visszamaradó, nem kötött antitest frakció jelölési aránya magasabb, mint az antitest törzsoldaté. Azonban a jelölést követően a nem kötődött antitestek DOL-ját a rossz jel/zaj arány miatt szintén nem tudtuk megmérni.

Az egyedi molekulák fluoreszcencia intenzitás eloszlása a törzsoldatokban nem mindig volt összhangban várakozásainkkal, pl.: magas jelölési arányú AlexaFluor647-tel konjugált trastuzumab antitest esetében a legalacsonyabb intenzitás értékekhez tartozó csúcs tartalmazta a legnagyobb számú molekulát. Ezt a jelenséget nagy F/P-jű antitestek esetében az önkialtásnak, illetve az ebből adódó nem lineáris intenzitásváltozásnak tulajdonítottuk. Másrészt fontolóra kell venni, hogy a különböző jelölési arányú antitest molekulák eloszlása egy törzsoldatban nem Poisson eloszlást követ, ami szintén magyarázná ezt a jelenséget. Azért, hogy a fluorofórokkal jelölt antitestekre a Poisson eloszlás feltételezése valóban helyes megközelítés legyen, a következő feltételeknek kell teljesednie: (i) minden lizin maradéknak azonos valószínűséggel kell a konjugációs reakcióban részt vennie; (ii) az egyes lizin oldalláncok jelölésének egymástól függetlennek kell lennie. Mivel az antitestek fluoreszcencia jelölése során valószínűleg egyik feltétel sem teljesül, ezért a Poisson eloszlást csak egy egyszerűsítő, praktikus megközelítésként lehet használni.

Összegzésként elmondható, hogy egy olyan kísérletes megközelítést hoztunk létre, amely jellemzi a fluoreszcens jelölés hatását az antitestek affinitására, illetve a fluorofórok kvantumhatékonyságára. Sikeresen kimutattuk azt, hogy a jelölés folyamata mind az antitest, mind a fluorofór tulajdonságait negatívan befolyásolja. A festék aggregátumok kialakulásának, illetve a nem-fluoreszcens dimerek felé történő energiatranszfernek köszönhetően a festékek kvantumhatékonysága csökken. Másrésről egy törzsoldatban lévő, többszörösen jelölt antitest specieszek affinitása csökken, ezért az antigénhez kötött frakcióban a magas jelölési arányú antitestek alulreprezentáltak lesznek. A bemutatott eredmények jelentősége olyan kísérletek során fontos, ahol szükséges az antigénhez kötött antitestek fluoreszcenciáját meghatározni. A kvantitatív, intenzitás alapú vagy ratiometrikus FRET méréseknél a számítások során bizonyos állandók (α vagy G faktor) szükségesek, amik a gerjesztett donort, illetve akceptort detektáló rendszer érzékenységét jellemzik. Az állandók meghatározásához használt fluoreszcens antitestek fluoreszcencia intenzitását normalizálni kell az antitest jelölési arányával, amire az antitest törzsoldat DOL értékét használjuk. Mivel eredményeink azt mutatták, hogy a kötött antitestek és az antitest oldatok jelölési aránya jelentősen eltér egymástól, ezért ezek a számítások helytelenek lesznek, és a használt korrekciós faktorok torzított becslését fogják eredményezni. Az antitestek jelölési aránya szintén fontos szuper-felbontású lokalizációs képalkotás során, ahol statisztikai számításokat használnak, és az antitest jelölési arányával korrigálnak. Ha a számítások során az antitest törzsoldat DOL-jára korrigálnak, a lokalizációk számát tévesen fogják meghatározni [108], [109]. Levonható az a következtetés, hogy a kvantitatív fluoreszcenciás mérések során célszerű alacsony jelölési arányú antitesteket választani.

7.2. Fluorofór szaturációs vizsgálatok

A Förster típusú rezonancia energiatranszfer (FRET) népszerű lehetőséget biztosít fehérje-fehérje interakciók vizsgálatára fiziológias és patológias körülmények között, amit rugalmasságának és viszonylagos könnyű használhatóságának köszönhet [5]. Annak ellenére, hogy számos mérési formája létezik, a legszélesebb körben elterjedt mégis az intenzitás alapú vagy ratiometrikus megközelítés, ahol vizsgálják a donor kioltását, illetve mérik a szenzitizált és közvetlenül gerjesztett akceptor fluoreszcenciáját [7]. Méréseink során a jobb jel-zaj arány elérése érdekében gyakran alkalmazunk erős gerjesztő intenzitást, ami fluorofór szaturációhoz vezet. Ilyen körülmények között a kibocsátott fluoreszcencia többé már nem egyenesen

arányos a megvilágító foton-fluxussal, mely a kiértékelések során megtévesztő lehet. Ezzel a problémával leginkább a mikroszkópos mérések során kell számolni, fluoriméteres és áramlási citometriás méréseknél, a gyenge gerjesztő intenzitásnak és az alacsony numerikus apertúrájú objektívnek (vagy az objektív hiányának) köszönhetően ez a jelenség nem áll fent. Habár a konfokális mikroszkópozás során gyakran alkalmazott lézerintenzitások mellett jelen van a szaturáció jelensége, mégsem veszik figyelembe az intenzitás alapú FRET számítások során.

Kísérleteink és modellrendszerünk alapján elmondható, hogy a FRET hatékonyság és annak meghatározásához szükséges α faktor nagymértékben függ a megvilágító fény intenzitásától. Minél magasabb a gerjesztő foton-fluxus, annál jobban csökken a hagyományos képlettel számított FRET hatékonyság. Megvizsgáltuk a jelenséget csak szingulett állapotot, illetve szingulett és triplet állapotot egyaránt feltételezve. Azzal a modellel, ahol kizárólag $S1 \rightarrow S0$ átmenetet feltételeztünk, hibát vétünk, mivel a triplet állapotot figyelmen kívül hagyjuk. Ezért számításba vettünk olyan rendszert is, ahol a fluorofórok triplet állapotban felhalmozódnak, de ezen modell gyakorlati alkalmazásához ismerni kellene az $S1 \rightarrow T1$ és $T1 \rightarrow S0$ átmenetek sebességi állandóit. Mivel ezek a paraméterek általában nem elérhetőek és kísérletesen nehezen határozhatóak meg, ezért az egyszerűbb, a triplet állapotot elhanyagoló modellel végeztük a FRET mérések kiértékelését. A triplet állapot elhanyagolásából eredő hibát kompenzálta az, hogy a valós foton-fluxust túlbecslő látszólagos foton-fluxust használtuk a kiértékelés során. Vizsgálataink kiterjedtek arra is, hogy bizonyítottuk, hogy valóban a donor szaturáció okozta a csökkenő FRET hatékonyságot a megvilágító fény intenzitásának függvényében. Számításaink során létrehoztunk három különböző, szaturációt figyelembe vevő FRET hatékonyság meghatározására szolgáló képletet: (i) hagyományos módszer donor szaturációra korrigált változata (l. 43. egyenlet), (ii) donor szaturációval számoló, (iii) donor szaturációt és FRET frusztrációt egyaránt figyelembe vevő képletek. Három különböző donor-akceptor pár mérési eredményei alapján látható, hogy az általunk alkalmazott módszerek nagymértékben eliminálták a FRET hatékonyság gerjesztő foton-fluxustól való függését, és sokkal megbízhatóbb eredményeket adtak. A fentebb említett módszereket a Matlabon belül futó rFRET [23] programban lehet használni. Alkalmazásakor jelentősen csökkenthető az energiatranszfer gerjesztő fénytől való függése. Hangsúlyozandó, hogy a szaturáció valós probléma a mikroszkópos képalkotás során, amit számításba kell venni a kvantitatívabb mérések, illetve a különböző eszközökön végrehajtott azonos típusú mérések azonos eredménye érdekében.

8. Összefoglalás

A fluoreszcens vizsgálatok, mérések során a minél jobb jel-zaj arány elérése érdekében a két leggyakrabban alkalmazott módszer az antitestek jelölési arányának növelése, illetve a gerjesztési fény intenzitásának fokozása. Ellenben ezek nem kívánatos módon befolyásolják méréseinket, ezzel téves számításokat eredményezve. Kísérleteink során kiderült, hogy az antitestek fluoreszcens festékekkel történő jelölése negatívan befolyásolja az antitestek affinitását és a fluoreszcens festékek kvantumhatékonyságát. A magas jelölési aránnyal rendelkező antitestek alulreprezentáltak lesznek a sejthez kötött frakcióban a csökkent affinitás miatt. Továbbá a fluorofórok között lejátszódó energiatranszfer, illetve kioltásos folyamatok csökkent fényességet fognak eredményezni. Mindezek mellett mikroszkópos mérések során a nagy numerikus apertúrájú objektív fókuszpontjában a megvilágító fény intenzitása olyan nagy, hogy a fluorofórok szaturálódnak. Modellszámításokkal és kísérletes mérésekkel is alátámasztottuk, hogy a hagyományos képlettel számolt FRET hatékonyság nagymértékben csökken a gerjesztő foton-fluxus függvényében. Sikeresen létrehoztunk olyan modelleket, melyek figyelembe veszik a donor szaturációt és a FRET frusztrációt is. Alkalmazásuknak köszönhetően a FRET hatékonyság és annak kiszámolásához szükséges α faktor szinte teljesen függetleníthető a megvilágító lézer intenzitásától. Összefoglalásként elmondható, hogy mindezen mérések, modellek, számítások nagymértékben hozzájárulnak a kvantitatívabb, pontosabb fluoreszcens mérések kivitelezéséhez.

9. Summary

In order to achieve the best possible signal-to-noise ratio during fluorescence measurements, the two most commonly used methods are to increase the labeling ratio of antibodies and to increase the intensity of the excitation light. Nonetheless, they affect our measurements undesirably, resulting in erroneous calculations. In our experiments, it was found that labeling antibodies with fluorescent dyes negatively affects the affinity of the antibodies and the quantum efficiency of the fluorescent dyes. Antibodies with high DOL will be underrepresented in the cell-bound fraction due to their decreased affinity. Furthermore, the energy transfer and quenching processes between the fluorophores will result in reduced brightness. In addition, during microscopic measurements, the intensity of the illumination light at the focal point of a large numerical aperture objective is so high that the fluorophores saturate. With model calculations and experimental measurements we also confirmed that the FRET efficiency calculated by the conventional formula greatly decreases as a function of the excitation photon flux. We have successfully created models that take both donor saturation and FRET frustration into consideration. By applying these equations the dependence on the illuminating laser intensity of the FRET efficiency and the α factor required FRET calculations can be almost completely eliminated. In summary, all these measurements, models and calculations significantly contribute to the implementation of more quantitative, accurate and device-independent fluorescence measurements.

10. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönettel tartozom témavezetőmnek Prof. Dr. Nagy Péternek munkám során nyújtott önzetlen segítségért, támogatásáért és azért, hogy hozzájárult elméleti és gyakorlati szakmai fejlődésemhez. Köszönetet mondok azért, hogy bármilyen problémával fordulhattam hozzá mindig megértő volt és igyekezett megoldást találni rá.

Szeretnék köszönetet mondani a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet jelenlegi és korábbi intézet vezetőinek Prof. Dr. Panyi Györgynek és Prof. Dr. Szöllősi Jánosnak, hogy lehetőséget nyújtottak arra, hogy az általuk vezetett intézetben dolgozhattam és lehetővé tették a doktori értekezésem elkészítését.

Szeretném megköszönni munkatársaimnak Vágóné Toldi Hajnalkának, Utasi-Szabó Ritának, Szilágyi Anikónak a fáradhatatlan segítségüket és nélkülözhetetlen tanácsaikat.

Köszönöm a hasznos iránymutatásait Prof. Dr. Vereb Györgynek és a hasznos gyakorlati segítségét Dr. Ujlaky-Nagy Lászlónak.

Köszönöm a segítségét munkacsoportunk összes tagjának, köztük Dr. Kovács Tamásnak, hogy bármikor fordulhattam hozzá szakmai tanácsért.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Nagyné Dr. Szabó Ágnesnek, Dr. Volkó Juliannának, Nagy Edinának, Dr. Batta Gyulának, Dr. Szalóki Nikolettának, Dr. Fazekas Zsoltnak hogy nem csak kollégáimként fordulhattam hozzájuk ügyes-bajos kérdéseimmel, hanem mára már a barátaimnak is tekinthetem őket és így igazán szebbé és könnyebbé, illetve izgalmasabbá teszik a munkával töltött mindennapokat.

Köszönöm barátaimnak Mázló Anettnek, Dr. Markovics Arnoldnak és Bartha Barbarának akik az elmúlt évek alatt végig támogattak.

Nem utolsó sorban köszönettel és hálával tartozom a Családomnak, akik nélkül nem ment volna. Köszönöm Férjemnek, aki fáradtságot nem kímélve mindig mellettem volt, velem együtt izgult és készült fel csodálatos hallgatósággént bármilyen feladatra. Köszönöm a Szüleimnek, akik sosem hagyták, hogy az utamba kerülő nehézségek miatt elkeseredjem, hanem támogató szavaikkal, lelkesítésükkel mindig ott álltak mellettem.

A PhD munka a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs hivatal támogatásával valósult meg (GINOP-2.3.2-15-2016-00044).

11. Irodalomjegyzék

- [1] J. R. Lakowicz, Szerk., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Boston, MA: Springer US, 2006.
- [2] H. C. Ishikawa-Ankerhold, R. Ankerhold, és G. P. C. Drummen, „Advanced Fluorescence Microscopy Techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM”, *Molecules*, köt. 17, sz. 4, o. 4047–4132, ápr. 2012, doi: 10.3390/molecules17044047.
- [3] J. Szöllosi, P. Nagy, Z. Sebestyén, S. Damjanovich, J. W. Park, és L. Mátyus, „Applications of fluorescence resonance energy transfer for mapping biological membranes”, *Rev. Mol. Biotechnol.*, köt. 82, sz. 3, o. 251–266, jan. 2002, doi: 10.1016/S1389-0352(01)00041-1.
- [4] E. A. Jares-Erijman és T. M. Jovin, „FRET imaging”, *Nat. Biotechnol.*, köt. 21, sz. 11, o. 1387–1395, nov. 2003, doi: 10.1038/nbt896.
- [5] H. E. Grecco és P. J. Verveer, „FRET in Cell Biology: Still Shining in the Age of Super- Resolution?”, *ChemPhysChem*, köt. 12, sz. 3, o. 484–490, febr. 2011, doi: 10.1002/cphc.201000795.
- [6] W. R. Algar, N. Hildebrandt, S. S. Vogel, és I. L. Medintz, „FRET as a biomolecular research tool — understanding its potential while avoiding pitfalls”, *Nat. Methods*, köt. 16, sz. 9, o. 815–829, szept. 2019, doi: 10.1038/s41592-019-0530-8.
- [7] R. M. Clegg, „Chapter 1 Förster resonance energy transfer—FRET what is it, why do it, and how it’s done”, in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, köt. 33, Elsevier, 2009, o. 1–57.
- [8] T. Zimmermann, „Photobleaching and Sensitized Emission-Based Methods for the Detection of Förster Resonance Energy Transfer”, in *Computer Optimized Microscopy*, köt. 2040, E. Rebollo és M. Bosch, Szerk. New York, NY: Springer New York, 2019, o. 235–274.
- [9] D. Shrestha, A. Jenei, P. Nagy, G. Vereb, és J. Szöllösi, „Understanding FRET as a Research Tool for Cellular Studies”, *Int. J. Mol. Sci.*, köt. 16, sz. 12, o. 6718–6756, márc. 2015, doi: 10.3390/ijms16046718.
- [10] D. S. Lidke és mtsai., „Imaging molecular interactions in cells by dynamic and static fluorescence anisotropy (rFLIM and emFRET)”, *Biochem. Soc. Trans.*, köt. 31, sz. 5, o. 1020–1027, okt. 2003, doi: 10.1042/bst0311020.
- [11] F. T. S. Chan, C. F. Kaminski, és G. S. Kaminski Schierle, „HomoFRET Fluorescence Anisotropy Imaging as a Tool to Study Molecular Self- Assembly in Live Cells”, *ChemPhysChem*, köt. 12, sz. 3, o. 500–509, febr. 2011, doi: 10.1002/cphc.201000833.
- [12] L. Ujlaky-Nagy, P. Nagy, J. Szöllösi, és G. Vereb, „Flow Cytometric FRET Analysis of Protein Interactions”, in *Flow Cytometry Protocols*, köt. 1678, T. S. Hawley és R. G. Hawley, Szerk. New York, NY: Springer New York, 2018, o. 393–419.
- [13] P. Nagy és mtsai., „Novel calibration method for flow cytometric fluorescence resonance energy transfer measurements between visible fluorescent proteins”, *Cytometry A*, köt. 67A, sz. 2, o. 86–96, okt. 2005, doi: 10.1002/cyto.a.20164.
- [14] J. Szöllosi, S. Damjanovich, és L. Mátyus, „Application of fluorescence resonance energy transfer in the clinical laboratory: routine and research”, *Cytometry*, köt. 34, sz. 4, o. 159–179, 0 1998.
- [15] B. W. van der Meer, „Kappa-squared: from nuisance to new sense”, *Rev. Mol. Biotechnol.*, köt. 82, sz. 3, o. 181–196, jan. 2002, doi: 10.1016/S1389-0352(01)00037-X.
- [16] B. Bajar, E. Wang, S. Zhang, M. Lin, és J. Chu, „A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs”, *Sensors*, köt. 16, sz. 9, o. 1488, szept. 2016, doi: 10.3390/s16091488.

- [17] J. Roszik, J. Szöllősi, és G. Vereb, „AccPbFRET: An ImageJ plugin for semi-automatic, fully corrected analysis of acceptor photobleaching FRET images”, *BMC Bioinformatics*, köt. 9, sz. 1, o. 346, 2008, doi: 10.1186/1471-2105-9-346.
- [18] C. Berney és G. Danuser, „FRET or No FRET: A Quantitative Comparison”, *Biophys. J.*, köt. 84, sz. 6, o. 3992–4010, jún. 2003, doi: 10.1016/S0006-3495(03)75126-1.
- [19] P. W. Vanderklish, L. A. Krushel, B. H. Holst, J. A. Gally, K. L. Crossin, és G. M. Edelman, „Marking synaptic activity in dendritic spines with a calpain substrate exhibiting fluorescence resonance energy transfer”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, köt. 97, sz. 5, o. 2253–2258, febr. 2000, doi: 10.1073/pnas.040565597.
- [20] A. W. Nguyen és P. S. Daugherty, „Evolutionary optimization of fluorescent proteins for intracellular FRET”, *Nat. Biotechnol.*, köt. 23, sz. 3, o. 355–360, márc. 2005, doi: 10.1038/nbt1066.
- [21] S. M. Müller, H. Galliardt, J. Schneider, B. G. Barisas, és T. Seidel, „Quantification of Förster resonance energy transfer by monitoring sensitized emission in living plant cells”, *Front. Plant Sci.*, köt. 4, 2013, doi: 10.3389/fpls.2013.00413.
- [22] B. Hochreiter, M. Kunze, B. Moser, és J. A. Schmid, „Advanced FRET normalization allows quantitative analysis of protein interactions including stoichiometries and relative affinities in living cells”, *Sci. Rep.*, köt. 9, sz. 1, o. 8233, dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-44650-0.
- [23] P. Nagy, Á. Szabó, T. Váradi, T. Kovács, G. Batta, és J. Szöllősi, „rFRET: A comprehensive, Matlab-based program for analyzing intensity-based ratiometric microscopic FRET experiments: Ratiometric FRET Analysis”, *Cytometry A*, köt. 89, sz. 4, o. 376–384, ápr. 2016, doi: 10.1002/cyto.a.22828.
- [24] N. Szalóki, Q. M. Doan-Xuan, J. Szöllősi, K. Tóth, G. Vámosi, és Z. Bacsó, „High throughput FRET analysis of protein-protein interactions by slide-based imaging laser scanning cytometry: High Throughput FRET Analysis by LSC”, *Cytometry A*, köt. 83, sz. 9, o. 818–829, szept. 2013, doi: 10.1002/cyto.a.22315.
- [25] T. Zal és N. R. J. Gascoigne, „Photobleaching-Corrected FRET Efficiency Imaging of Live Cells”, *Biophys. J.*, köt. 86, sz. 6, o. 3923–3939, jún. 2004, doi: 10.1529/biophysj.103.022087.
- [26] P. Nagy, G. Vereb, S. Damjanovich, L. Mátyus, és J. Szöllősi, „Measuring FRET in Flow Cytometry and Microscopy”, *Curr. Protoc. Cytom.*, köt. 38, sz. 1, o. 12.8.1–12.8.13, okt. 2006, doi: 10.1002/0471142956.cy1208s38.
- [27] G. Vereb, P. Nagy, és J. Szöllősi, „Flow Cytometric FRET Analysis of Protein Interaction”, in *Flow Cytometry Protocols*, köt. 699, T. S. Hawley és R. G. Hawley, Szerk. Totowa, NJ: Humana Press, 2011, o. 371–392.
- [28] Z. Sebestyén és mtsai., „Long wavelength fluorophores and cell-by-cell correction for autofluorescence significantly improves the accuracy of flow cytometric energy transfer measurements on a dual-laser benchtop flow cytometer: Improving FCET by Autofluorescence Correction”, *Cytometry*, köt. 48, sz. 3, o. 124–135, júl. 2002, doi: 10.1002/cyto.10121.
- [29] P. Nagy, G. Vámosi, A. Bodnár, S. J. Lockett, és J. Szöllősi, „Intensity-based energy transfer measurements in digital imaging microscopy”, *Eur. Biophys. J.*, köt. 27, sz. 4, o. 377–389, jún. 1998, doi: 10.1007/s002490050145.
- [30] Y. Chen, J. P. Mauldin, R. N. Day, és A. Periasamy, „Characterization of spectral FRET imaging microscopy for monitoring nuclear protein interactions”, *J. Microsc.*, köt. 228, sz. 2, o. 139–152, nov. 2007, doi: 10.1111/j.1365-2818.2007.01838.x.
- [31] D. Megías és mtsai., „Novel lambda FRET spectral confocal microscopy imaging method”, *Microsc. Res. Tech.*, köt. 72, sz. 1, o. 1–11, jan. 2009, doi: 10.1002/jemt.20633.

- [32] G. Szentesi és mtsai., „Computer program for analyzing donor photobleaching FRET image series”, *Cytometry A*, köt. 67A, sz. 2, o. 119–128, okt. 2005, doi: 10.1002/cyto.a.20175.
- [33] M. Y. Berezin és S. Achilefu, „Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging”, *Chem. Rev.*, köt. 110, sz. 5, o. 2641–2684, máj. 2010, doi: 10.1021/cr900343z.
- [34] G. Redford és R. M. Clegg, „Real-Time Fluorescence Lifetime Imaging and FRET Using Fast-Gated Image Intensifiers”, in *Molecular Imaging*, Elsevier, 2005, o. 193–226.
- [35] H. C. Gerritsen, A. V. Agronskaia, A. N. Bader, és A. Esposito, „Chapter 3 Time domain FLIM: Theory, instrumentation, and data analysis”, in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, köt. 33, Elsevier, 2009, o. 95–132.
- [36] P. J. Verveer és Q. S. Hanley, „Chapter 2 Frequency domain FLIM theory, instrumentation, and data analysis”, in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, köt. 33, Elsevier, 2009, o. 59–94.
- [37] Y. Sun, C. Rombola, V. Jyothikumar, és A. Periasamy, „Förster resonance energy transfer microscopy and spectroscopy for localizing protein-protein interactions in living cells: FRET Microscopy and Spectroscopy”, *Cytometry A*, köt. 83, sz. 9, o. 780–793, szept. 2013, doi: 10.1002/cyto.a.22321.
- [38] D. S. Goodsell, „The Molecular Perspective: Antibodies”, *Stem Cells*, köt. 20, sz. 1, o. 94–95, jan. 2002, doi: 10.1634/stemcells.20-1-94.
- [39] N. S. Lipman, L. R. Jackson, L. J. Trudel, és F. Weis-Garcia, „Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources”, *ILAR J.*, köt. 46, sz. 3, o. 258–268, jan. 2005, doi: 10.1093/ilar.46.3.258.
- [40] A. Erdei, *Immunológia*, 4. átdolgozott kiadás. Budapest: Medicina, 2012.
- [41] Z. Li és G.-Y. Chen, „Current Conjugation Methods for Immunosensors”, *Nanomaterials*, köt. 8, sz. 5, o. 278, ápr. 2018, doi: 10.3390/nano8050278.
- [42] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*. Elsevier, 2013.
- [43] M. Brinkley, „A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens and crosslinking reagents”, *Bioconjug. Chem.*, köt. 3, sz. 1, o. 2–13, jan. 1992, doi: 10.1021/bc00013a001.
- [44] R. P. Haugland, „Coupling of Monoclonal Antibodies with Fluorophores”, in *Monoclonal Antibody Protocols*, köt. 45, New Jersey: Humana Press, 1995, o. 205–222.
- [45] G. Ya. Wiederschain, „The Molecular Probes handbook. A guide to fluorescent probes and labeling technologies: (I. Johnson and M. Spence (eds.) 11th Edition, Life Technologies, 2010, 1060 p., \$100)”, *Biochem. Mosc.*, köt. 76, sz. 11, o. 1276–1276, nov. 2011, doi: 10.1134/S0006297911110101.
- [46] M. Pereira és E. P. Lai, „Capillary electrophoresis for the characterization of quantum dots after non-selective or selective bioconjugation with antibodies for immunoassay”, *J. Nanobiotechnology*, köt. 6, sz. 1, o. 10, 2008, doi: 10.1186/1477-3155-6-10.
- [47] D. Shrestha, A. Bagosi, J. Szöllősi, és A. Jenei, „Comparative study of the three different fluorophore antibody conjugation strategies”, *Anal. Bioanal. Chem.*, köt. 404, sz. 5, o. 1449–1463, szept. 2012, doi: 10.1007/s00216-012-6232-z.
- [48] A. Janda, A. Bowen, N. S. Greenspan, és A. Casadevall, „Ig Constant Region Effects on Variable Region Structure and Function”, *Front. Microbiol.*, köt. 7, febr. 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.00022.
- [49] M. Adamczyk, J. Grote, J. A. Moore, S. D. Rege, és Z. Yu, „Structure-Binding Relationships for the Interaction between a Vancomycin Monoclonal Antibody Fab

- Fragment and a Library of Vancomycin Analogues and Tracers”, *Bioconjug. Chem.*, köt. 10, sz. 2, o. 176–185, márc. 1999, doi: 10.1021/bc980135i.
- [50] T. McCormack, G. O’Keeffe, B. Mac Craith, és R. O’Kennedy, „Assessment of the Effect of Increased Fluorophore Labelling on the Binding Ability of an Antibody”, *Anal. Lett.*, köt. 29, sz. 6, o. 953–968, ápr. 1996, doi: 10.1080/00032719608001447.
- [51] S. Vira, E. Mekhedov, G. Humphrey, és P. S. Blank, „Fluorescent-labeled antibodies: Balancing functionality and degree of labeling”, *Anal. Biochem.*, köt. 402, sz. 2, o. 146–150, júl. 2010, doi: 10.1016/j.ab.2010.03.036.
- [52] V. Schnaible és M. Przybylski, „Identification of Fluorescein-5’-Isothiocyanate-Modification Sites in Proteins by Electrospray-Ionization Mass Spectrometry”, *Bioconjug. Chem.*, köt. 10, sz. 5, o. 861–866, szept. 1999, doi: 10.1021/bc990039x.
- [53] G. Grunwaldt, S. Haebel, C. Spitz, M. Steup, és R. Menzel, „Multiple binding sites of fluorescein isothiocyanate moieties on myoglobin: photophysical heterogeneity as revealed by ground- and excited-state spectroscopy”, *J. Photochem. Photobiol. B*, köt. 67, sz. 3, o. 177–186, júl. 2002, doi: 10.1016/S1011-1344(02)00323-8.
- [54] Y. Sako, S. Minoghchi, és T. Yanagida, „Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells”, *Nat. Cell Biol.*, köt. 2, sz. 3, o. 168–172, márc. 2000, doi: 10.1038/35004044.
- [55] P. S. Petrou, C. Mastichiadis, I. Christofidis, és S. E. Kakabakos, „Glycerin Suppression of Fluorescence Self-Quenching and Improvement of Heterogeneous Fluoroimmunoassay Sensitivity”, *Anal. Chem.*, köt. 79, sz. 2, o. 647–653, jan. 2007, doi: 10.1021/ac061492m.
- [56] J.-M. Swiecicki és mtsai., „How to unveil self-quenched fluorophores and subsequently map the subcellular distribution of exogenous peptides”, *Sci. Rep.*, köt. 6, sz. 1, o. 20237, ápr. 2016, doi: 10.1038/srep20237.
- [57] S. Hamann, J. F. Kiilgaard, T. Litman, F. J. Alvarez-Leefmans, B. R. Winther, és T. Zeuthen, „Measurement of Cell Volume Changes by Fluorescence Self-Quenching”, *J. Fluoresc.*, köt. 12, sz. 2, o. 139–145, 2002, doi: 10.1023/A:1016832027325.
- [58] R. F. Chen és J. R. Knutson, „Mechanism of fluorescence concentration quenching of carboxyfluorescein in liposomes: Energy transfer to nonfluorescent dimers”, *Anal. Biochem.*, köt. 172, sz. 1, o. 61–77, júl. 1988, doi: 10.1016/0003-2697(88)90412-5.
- [59] X. Zhuang, T. Ha, H. D. Kim, T. Centner, S. Labeit, és S. Chu, „Fluorescence quenching: A tool for single-molecule protein-folding study”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, köt. 97, sz. 26, o. 14241–14244, dec. 2000, doi: 10.1073/pnas.97.26.14241.
- [60] B. Wu, K. D. Piatkevich, T. Lionnet, R. H. Singer, és V. V. Verkhusha, „Modern fluorescent proteins and imaging technologies to study gene expression, nuclear localization, and dynamics”, *Curr. Opin. Cell Biol.*, köt. 23, sz. 3, o. 310–317, jún. 2011, doi: 10.1016/j.ceb.2010.12.004.
- [61] M. Zimmer, „Introduction to fluorescent proteins”, in *The Fluorescent Protein Revolution*, Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2014.
- [62] N. Soleja, O. Manzoor, I. Khan, A. Ahmad, és M. Mohsin, „Role of green fluorescent proteins and their variants in development of FRET-based sensors”, *J. Biosci.*, köt. 43, sz. 4, o. 763–784, szept. 2018.
- [63] G. H. Patterson, S. M. Knobel, W. D. Sharif, S. R. Kain, és D. W. Piston, „Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy”, *Biophys. J.*, köt. 73, sz. 5, o. 2782–2790, nov. 1997, doi: 10.1016/S0006-3495(97)78307-3.
- [64] G.-J. Kremers, S. G. Gilbert, P. J. Cranfill, M. W. Davidson, és D. W. Piston, „Fluorescent proteins at a glance”, *J. Cell Sci.*, köt. 124, sz. 2, o. 157–160, jan. 2011, doi: 10.1242/jcs.072744.

- [65] P. Dedecker, F. C. De Schryver, és J. Hofkens, „Fluorescent Proteins: Shine on, You Crazy Diamond”, *J. Am. Chem. Soc.*, köt. 135, sz. 7, o. 2387–2402, febr. 2013, doi: 10.1021/ja309768d.
- [66] T. Köker, A. Fernandez, és F. Pinaud, „Characterization of Split Fluorescent Protein Variants and Quantitative Analyses of Their Self-Assembly Process”, *Sci. Rep.*, köt. 8, sz. 1, o. 5344, dec. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-23625-7.
- [67] C. Jing és V. W. Cornish, „Chemical Tags for Labeling Proteins Inside Living Cells”, *Acc. Chem. Res.*, köt. 44, sz. 9, o. 784–792, szept. 2011, doi: 10.1021/ar200099f.
- [68] R. A. Scheck és A. Schepartz, „Surveying Protein Structure and Function Using Bis-Arsenical Small Molecules”, *Acc. Chem. Res.*, köt. 44, sz. 9, o. 654–665, szept. 2011, doi: 10.1021/ar2001028.
- [69] C. Hoffmann és mtsai., „Fluorescent labeling of tetracysteine-tagged proteins in intact cells”, *Nat. Protoc.*, köt. 5, sz. 10, o. 1666–1677, okt. 2010, doi: 10.1038/nprot.2010.129.
- [70] N. George, „A new method for protein labeling with small molecules based on acyl carrier protein”. Lausanne, EPFL, 2006.
- [71] N. George, H. Pick, H. Vogel, N. Johnsson, és K. Johnsson, „Specific Labeling of Cell Surface Proteins with Chemically Diverse Compounds”, *J. Am. Chem. Soc.*, köt. 126, sz. 29, o. 8896–8897, júl. 2004, doi: 10.1021/ja048396s.
- [72] M. Rothmann, N. M. Kosa, és M. D. Burkart, „Resin supported acyl carrier protein labeling strategies”, *RSC Adv*, köt. 4, sz. 18, o. 9092–9097, 2014, doi: 10.1039/C3RA47847E.
- [73] M. Rashidian, J. K. Dozier, és M. D. Distefano, „Enzymatic Labeling of Proteins: Techniques and Approaches”, *Bioconjug. Chem.*, köt. 24, sz. 8, o. 1277–1294, aug. 2013, doi: 10.1021/bc400102w.
- [74] T. Gronemeyer, C. Chidley, A. Juillerat, C. Heinis, és K. Johnsson, „Directed evolution of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase for applications in protein labeling”, *Protein Eng. Des. Sel.*, köt. 19, sz. 7, o. 309–316, ápr. 2006, doi: 10.1093/protein/gzl014.
- [75] G. Crivat és J. W. Taraska, „Imaging proteins inside cells with fluorescent tags”, *Trends Biotechnol.*, köt. 30, sz. 1, o. 8–16, jan. 2012, doi: 10.1016/j.tibtech.2011.08.002.
- [76] A. Benke, N. Olivier, J. Gunzenhäuser, és S. Manley, „Multicolor Single Molecule Tracking of Stochastically Active Synthetic Dyes”, *Nano Lett.*, köt. 12, sz. 5, o. 2619–2624, máj. 2012, doi: 10.1021/nl301018r.
- [77] A. Gautier és mtsai., „An Engineered Protein Tag for Multiprotein Labeling in Living Cells”, *Chem. Biol.*, köt. 15, sz. 2, o. 128–136, febr. 2008, doi: 10.1016/j.chembiol.2008.01.007.
- [78] M. A. Brun, K.-T. Tan, E. Nakata, M. J. Hinner, és K. Johnsson, „Semisynthetic Fluorescent Sensor Proteins Based on Self-Labeling Protein Tags”, *J. Am. Chem. Soc.*, köt. 131, sz. 16, o. 5873–5884, ápr. 2009, doi: 10.1021/ja900149e.
- [79] A. Gautier, E. Nakata, G. Lukinavičius, K.-T. Tan, és K. Johnsson, „Selective Cross-Linking of Interacting Proteins Using Self-Labeling Tags”, *J. Am. Chem. Soc.*, köt. 131, sz. 49, o. 17954–17962, dec. 2009, doi: 10.1021/ja907818q.
- [80] H. C. Kolb, M. G. Finn, és K. B. Sharpless, „Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions”, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, köt. 40, sz. 11, o. 2004–2021, jún. 2001, doi: 10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::aid-anie2004>3.3.co;2-x.
- [81] M. Yang, J. Li, és P. R. Chen, „Transition metal-mediated bioorthogonal protein chemistry in living cells”, *Chem Soc Rev*, köt. 43, sz. 18, o. 6511–6526, 2014, doi: 10.1039/C4CS00117F.

- [82] L. Li és Z. Zhang, „Development and Applications of the Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC) as a Bioorthogonal Reaction”, *Molecules*, köt. 21, sz. 10, o. 1393, okt. 2016, doi: 10.3390/molecules21101393.
- [83] K. Horisawa, „Specific and quantitative labeling of biomolecules using click chemistry”, *Front. Physiol.*, köt. 5, o. 457, 2014, doi: 10.3389/fphys.2014.00457.
- [84] N. J. Agard, J. A. Prescher, és C. R. Bertozzi, „A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems”, *J. Am. Chem. Soc.*, köt. 126, sz. 46, o. 15046–15047, nov. 2004, doi: 10.1021/ja044996f.
- [85] E. M. Sletten és C. R. Bertozzi, „From Mechanism to Mouse: A Tale of Two Bioorthogonal Reactions”, *Acc. Chem. Res.*, köt. 44, sz. 9, o. 666–676, szept. 2011, doi: 10.1021/ar200148z.
- [86] M. L. Blackman, M. Royzen, és J. M. Fox, „Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation Based on Inverse-Electron-Demand Diels–Alder Reactivity”, *J. Am. Chem. Soc.*, köt. 130, sz. 41, o. 13518–13519, okt. 2008, doi: 10.1021/ja8053805.
- [87] Y. Takayama, K. Kusamori, és M. Nishikawa, „Click Chemistry as a Tool for Cell Engineering and Drug Delivery”, *Molecules*, köt. 24, sz. 1, o. 172, jan. 2019, doi: 10.3390/molecules24010172.
- [88] L. W. Runnels és S. F. Scarlata, „Theory and application of fluorescence homotransfer to melittin oligomerization”, *Biophys. J.*, köt. 69, sz. 4, o. 1569–1583, okt. 1995, doi: 10.1016/S0006-3495(95)80030-5.
- [89] L. Trón, J. Szöllösi, S. Damjanovich, S. H. Helliwell, D. J. Arndt-Jovin, és T. M. Jovin, „Flow cytometric measurement of fluorescence resonance energy transfer on cell surfaces. Quantitative evaluation of the transfer efficiency on a cell-by-cell basis”, *Biophys. J.*, köt. 45, sz. 5, o. 939–946, máj. 1984, doi: 10.1016/S0006-3495(84)84240-X.
- [90] T. Szendi-Szalmáry, Á. Szabó, J. Szöllösi, és P. Nagy, „Reducing the Detrimental Effects of Saturation Phenomena in FRET Microscopy”, *Anal. Chem.*, köt. 91, sz. 9, o. 6378–6382, máj. 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.9b01504.
- [91] Z. Zolmajd-Haghighi és Q. S. Hanley, „When One Plus One Does Not Equal Two: Fluorescence Anisotropy in Aggregates and Multiply Labeled Proteins”, *Biophys. J.*, köt. 106, sz. 7, o. 1457–1466, ápr. 2014, doi: 10.1016/j.bpj.2014.02.020.
- [92] R. Luchowski és mtsai., „Single molecule studies of multiple-fluorophore labeled antibodies. Effect of homo-FRET on the number of photons available before photobleaching”, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, köt. 9, sz. 5, o. 411–420, okt. 2008, doi: 10.2174/138920108785915094.
- [93] Á. Szabó, G. Horváth, J. Szöllösi, és P. Nagy, „Quantitative Characterization of the Large-Scale Association of ErbB1 and ErbB2 by Flow Cytometric Homo-FRET Measurements”, *Biophys. J.*, köt. 95, sz. 4, o. 2086–2096, aug. 2008, doi: 10.1529/biophysj.108.133371.
- [94] E. K. L. Yeow és A. H. A. Clayton, „Enumeration of Oligomerization States of Membrane Proteins in Living Cells by Homo-FRET Spectroscopy and Microscopy: Theory and Application”, *Biophys. J.*, köt. 92, sz. 9, o. 3098–3104, máj. 2007, doi: 10.1529/biophysj.106.099424.
- [95] A. Eisfeld és J. S. Briggs, „The J- and H-bands of organic dye aggregates”, *Chem. Phys.*, köt. 324, sz. 2–3, o. 376–384, máj. 2006, doi: 10.1016/j.chemphys.2005.11.015.
- [96] A. K. Chibisov, „Photonics of dimers of cyanine dyes”, *High Energy Chem.*, köt. 41, sz. 3, o. 200–209, máj. 2007, doi: 10.1134/S0018143907030071.
- [97] K. G. Vladimirova, A. Ya. Freidzon, A. A. Bagatur—yants, G. V. Zakharova, A. K. Chibisov, és M. V. Alfimov, „Modeling the structure, absorption spectra, and cis-trans

- isomerization of thiocarbocyanine dyes”, *High Energy Chem.*, köt. 42, sz. 4, o. 275–282, júl. 2008, doi: 10.1134/S0018143908040061.
- [98] R. Y. Tsien, L. Ernst, és A. Waggoner, „Fluorophores for Confocal Microscopy: Photophysics and Photochemistry”, in *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*, J. B. Pawley, Szerk. Boston, MA: Springer US, 2006, o. 338–352.
- [99] J. Widengren és R. Rigler, „Fluorescence correlation spectroscopy as a tool to investigate chemical reactions in solutions and on cell surfaces”, *Cell. Mol. Biol. Noisy-Gd. Fr.*, köt. 44, sz. 5, o. 857–879, júl. 1998.
- [100] D. Netti és mtsai., „Excited-state annihilation reduces power dependence of single-molecule FRET experiments”, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, köt. 17, sz. 48, o. 32304–32315, 2015, doi: 10.1039/C5CP05321H.
- [101] A. K. Kenworthy és M. Edidin, „Distribution of a Glycosylphosphatidylinositol-anchored Protein at the Apical Surface of MDCK Cells Examined at a Resolution of <100 Å Using Imaging Fluorescence Resonance Energy Transfer”, *J. Cell Biol.*, köt. 142, sz. 1, o. 69–84, júl. 1998, doi: 10.1083/jcb.142.1.69.
- [102] A. K. Kenworthy, N. Petranova, és M. Edidin, „High-Resolution FRET Microscopy of Cholera Toxin B-Subunit and GPI-anchored Proteins in Cell Plasma Membranes”, *Mol. Biol. Cell*, köt. 11, sz. 5, o. 1645–1655, máj. 2000, doi: 10.1091/mbc.11.5.1645.
- [103] K.-H. Hur és J. D. Mueller, „Quantitative Brightness Analysis of Fluorescence Intensity Fluctuations in *E. Coli*”, *PLOS ONE*, köt. 10, sz. 6, o. e0130063, jún. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0130063.
- [104] J. E. Berlier és mtsai., „Quantitative Comparison of Long-wavelength Alexa Fluor Dyes to Cy Dyes: Fluorescence of the Dyes and Their Bioconjugates”, *J. Histochem. Cytochem.*, köt. 51, sz. 12, o. 1699–1712, dec. 2003, doi: 10.1177/002215540305101214.
- [105] R. I. MacDonald, „Characteristics of self-quenching of the fluorescence of lipid-conjugated rhodamine in membranes”, *J. Biol. Chem.*, köt. 265, sz. 23, o. 13533–13539, 0 1990.
- [106] L. R. Stingaciu, O. Ivanova, M. Ohl, R. Biehl, és D. Richter, „Fast antibody fragment motion: flexible linkers act as entropic spring”, *Sci. Rep.*, köt. 6, sz. 1, o. 22148, ápr. 2016, doi: 10.1038/srep22148.
- [107] C. De Michele, P. De Los Rios, G. Foffi, és F. Piazza, „Simulation and Theory of Antibody Binding to Crowded Antigen-Covered Surfaces”, *PLOS Comput. Biol.*, köt. 12, sz. 3, o. e1004752, márc. 2016, doi: 10.1371/journal.pcbi.1004752.
- [108] R. P. J. Nieuwenhuizen, M. Bates, A. Szymborska, K. A. Lidke, B. Rieger, és S. Stallinga, „Quantitative Localization Microscopy: Effects of Photophysics and Labeling Stoichiometry”, *PLOS ONE*, köt. 10, sz. 5, o. e0127989, máj. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0127989.
- [109] M. Heilemann és mtsai., „Subdiffraction-Resolution Fluorescence Imaging with Conventional Fluorescent Probes”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, köt. 47, sz. 33, o. 6172–6176, aug. 2008, doi: 10.1002/anie.200802376.

12. Tárgyszavak

antitest

antitest jelölés

jelölési arány

fluorofór

antitest affinitás

festék kvantumhatékonyság

FRET

FRET hatékonyság

fluorofór szaturáció

FRET frusztráció

mikroszkópia

foton-fluxus

13. Keywords

antibody

labeling of antibody

affinity of antibody

quantum efficiency of dye

FRET

FRET efficiency

fluorophore saturation

FRET frustration

microscopy

photon flux

14. Melléklet

A fluorofór szaturáció jelenlétében végzett FRET mérésekhez használt MATLAB fájlok

```
function
[fret,id,ia]=fretWithSat_1(i1,i2,i3,S1,S2,S3,S4,alphaSat,tauD,tauA,sigmaD,sigmaDa,sigmaA,sigmaAd,phiD,phiA)
% This function takes the saturation of donor and acceptor fluorescence
% into consideration, but neglects FRET frustration as a result of acceptor
% saturation.
%
% i1,i2,i3 - intensities measured in the donor, FRET and acceptor channel,
% respectively
% S1,S2,S3,S4 - overspill parameters
% alphaSat,alphaClassic - parameter alpha calculated considering and
% disregarding fluorophore saturation, respectively
% tauD,tauA - fluorescence lifetime of the donor and acceptor, respectively
% sigmaD,sigmaDa - absorption cross-section of the donor at the donor and
% acceptor excitation wavelength, respectively
% sigmaA,sigmaAd - absorption cross-section of the acceptor at the acceptor
% and donor excitation wavelength, respectively
% phiD,phiA - photon flux of the donor- and acceptor-exciting laser,
% respectively
%
% fret,id,ia - solutions (FRET efficiency, unquenched donor intensity,
% directly-excited acceptor intensity)
%
% Dsat0d - fractional saturation of the donor at the donor excitation
% wavelength
% Dsat0a - fractional saturation of the donor at the acceptor excitation
% wavelength
% Asat0a - fractional saturation of the acceptor at the acceptor excitation
% wavelength
% Asat0d - fractional saturation of the acceptor at the donor excitation
% wavelength
%
% Peter Nagy, email: peter.v.nagy@gmail.com
Dsat0d=sigmaD.*tauD.*phiD.*(1+sigmaD.*tauD.*phiD).^(-1);
Dsat0a=sigmaDa.*tauD.*phiA.*(1+sigmaDa.*tauD.*phiA).^(-1);
Asat0d=sigmaAd.*tauA.*phiD.*(1+sigmaAd.*tauA.*phiD).^(-1);
Asat0a=sigmaA.*tauA.*phiA.*(1+sigmaA.*tauA.*phiA).^(-1);
fret=(1/2).*(Dsat0d.^(-1).*(Asat0a.*S2.*(Dsat0d.*S3.*(i1.*S2+(-
1).*i2.*S4)+Dsat0a.*(i2+(-1).*i1.*S1+(-1).*i3.*S2+i3.*S1.*S4)))+(Asat0a+(-
1).*Asat0d).*(Dsat0a.*(i1.*S2+(-1).*i2.*S4).*(alphaSat).^(-1).*(Asat0d.*((-
1)+Asat0a).*(Dsat0a+(-1).*Asat0a.*Dsat0d).*(i1.*S2+(-
1).*i2.*S4).*(alphaSat+(-1).*(-4).*Asat0a.*Dsat0d.^2.*S2.*(i1.*(S1+(-
1).*S2.*S3)+i3.*(S2+(-1).*S1.*S4)+i2.*((-
1)+S3.*S4)).*(Asat0a.*S2.*(Dsat0d.*S3.*((-1).*i1.*S2+i2.*S4)+Dsat0a.*((-
1).*i2+i1.*S1+i3.*S2+(-1).*i3.*S1.*S4)))+( (-
1).*Asat0a+Asat0d).*(Dsat0a.*(i1.*S2+(-
1).*i2.*S4).*(alphaSat)+(Asat0a.*Dsat0d.*S2.*((-1)+(-
1).*Dsat0a).*(i2+(1+Dsat0a).*(i1.*S1+(-
1).*(1+Dsat0d).*(i1.*S2.*S3+(1+Dsat0d).*(i2.*S3.*S4+(1+Dsat0a).*(i3.*(S2+(-
1).*S1.*S4)))+(1+(-1).*Asat0a).*(Asat0d.*Dsat0a+Asat0a.*((-
1)+Asat0d).*(Dsat0d).*(i1.*S2+(-
1).*i2.*S4).*(alphaSat).^2).^(1/2)+Asat0a.*Dsat0d.*(i2.*S2.*(1+Dsat0a+(-
1).*(1+Dsat0d).*(S3.*S4)+(-1).*i2.*S4.*alphaSat+S2.*((1+Dsat0a).*(i3.*((-
1).*S2+S1.*S4)+i1.*((-1)+(-
1).*Dsat0a).*(S1+(1+Dsat0d).*(S2.*S3+alphaSat))))));
```

```

fd=(1/2).*Dsat0d.^(-1).* (Asat0a.*Asat0d.*Dsat0d+Asat0a.*((-
1)+Dsat0a).*Dsat0d+(-1).*Asat0d.*Dsat0a.*((-1)+Asat0a+Dsat0d)).^(-
1).* (S2+(-1).*S1.*S4).^(-1).*alphaSat.^(-1).* (Asat0a.*((-
1)+Dsat0d).*Dsat0d.*S2.*((-1)+Dsat0a).*i1.*S1+(-1).*((-
1)+Dsat0d).*i1.*S2.*S3+((-1)+Dsat0a).*i3.* (S2+(-1).*S1.*S4)+(-1).*i2.*((-
1)+Dsat0a+S3.*S4+(-1).*Dsat0d.*S3.*S4))+(-1).* (Asat0d.* (Dsat0a+(-
1).*Dsat0d).* (1+Dsat0d)+Dsat0d.* (1+(-2).*Dsat0a+Dsat0d)).* (i1.*S2+(-
1).*i2.*S4).*alphaSat)+((-1)+Dsat0d).* (Asat0d.*Dsat0a.*((-
1).*i1.*S2+i2.*S4).*alphaSat+(Asat0d.^2.*Dsat0a.^2.* (i1.*S2+(-
1).*i2.*S4).^2.*alphaSat.^2+(-2).*Asat0a.*Asat0d.*Dsat0a.* (i1.*S2+(-
1).*i2.*S4).*alphaSat.* (Dsat0d.*S2.*((-1).*i1.* (1+Dsat0a+(-
2).*Dsat0d).*S1+((-1)+Dsat0d).*S2.*S3)+(-1).* (1+Dsat0a+(-
2).*Dsat0d).*i3.* (S2+(-1).*S1.*S4)+i2.* (1+Dsat0a+(-2).*Dsat0d+((-
1)+Dsat0d).*S3.*S4))+ (Asat0d.* (Dsat0a+(-1).*Dsat0d)+Dsat0d).* (i1.*S2+(-
1).*i2.*S4).*alphaSat)+Asat0a.^2.* (Dsat0d.^2.*S2.^2.* (i1.* (S1+(-
1).*Dsat0a.*S1+((-1)+Dsat0d).*S2.*S3)+(-1).* ((-1)+Dsat0a).*i3.* (S2+(-
1).*S1.*S4)+i2.* ((-1)+Dsat0a+S3.*S4+(-
1).*Dsat0d.*S3.*S4)).^2+2.*Dsat0d.*S2.* (i1.*S2+(-
1).*i2.*S4).* (Dsat0d.* (i2+(-1).*Dsat0a.*i2+((-1)+Dsat0a).*i1.*S1+(1+(-
2).*Dsat0a+Dsat0d).*i1.*S2.*S3+(-1).* (1+(-
2).*Dsat0a+Dsat0d).*i2.*S3.*S4+((-1)+Dsat0a).*i3.* (S2+(-
1).*S1.*S4))+Asat0d.* (Dsat0a+(-1).*Dsat0d).* ((-1)+(-
1).*Dsat0a).*i1.*S1+(1+Dsat0d).*i1.*S2.*S3+(1+Dsat0a).*i3.* ((-
1).*S2+S1.*S4)+i2.* (1+Dsat0a+(-
1).* (1+Dsat0d).*S3.*S4))).*alphaSat+(Asat0d.* (Dsat0a+(-
1).*Dsat0d)+Dsat0d).^2.* (i1.*S2+(-1).*i2.*S4).^2.*alphaSat.^2)).^(1/2)));
fa=(1/2).*Asat0a.^(-1).* (Asat0a.*Asat0d.*Dsat0d+Asat0a.*((-
1)+Dsat0a).*Dsat0d+(-1).*Asat0d.*Dsat0a.*((-1)+Asat0a+Dsat0d)).^(-
1).*S2.^(-1).* (S2+(-1).*S1.*S4).^(-1).* (2.*Asat0d.*Dsat0a.*i2.*S2+(-
2).*Asat0a.*Asat0d.*Dsat0a.*i2.*S2+(-
1).*Asat0a.*Dsat0d.*i2.*S2+Asat0a.*Asat0d.*Dsat0d.*i2.*S2+Asat0a.*Dsat0a.*D
sat0d.*i2.*S2+(-
2).*Asat0d.*Dsat0a.*Dsat0d.*i2.*S2+Asat0a.*Asat0d.*Dsat0a.*Dsat0d.*i2.*S2+(-
1).*Asat0a.*Dsat0d.*i3.*S2.^2+Asat0a.*Asat0d.*Dsat0d.*i3.*S2.^2+Asat0a.*Dsa
t0a.*Dsat0d.*i3.*S2.^2+(-
1).*Asat0a.*Asat0d.*Dsat0a.*Dsat0d.*i3.*S2.^2+Asat0a.*Dsat0d.*i3.*S1.*S2.*S
4+(-1).*Asat0a.*Asat0d.*Dsat0d.*i3.*S1.*S2.*S4+(-
1).*Asat0a.*Dsat0a.*Dsat0d.*i3.*S1.*S2.*S4+Asat0a.*Asat0d.*Dsat0a.*Dsat0d.*
i3.*S1.*S2.*S4+(-
1).*Asat0a.*Dsat0d.*i2.*S2.*S3.*S4+Asat0a.*Asat0d.*Dsat0d.*i2.*S2.*S3.*S4+A
sat0a.*Dsat0d.^2.*i2.*S2.*S3.*S4+(-
1).*Asat0a.*Asat0d.*Dsat0d.^2.*i2.*S2.*S3.*S4+(-
1).*Asat0d.*Dsat0a.*i2.*S4.*alphaSat+Asat0a.*Asat0d.*Dsat0a.*i2.*S4.*alphaS
at+Asat0d.^2.*Dsat0a.*i2.*S4.*alphaSat+(-
1).*Asat0a.*Asat0d.^2.*Dsat0a.*i2.*S4.*alphaSat+Asat0a.*Dsat0d.*i2.*S4.*alp
haSat+(-
2).*Asat0a.*Asat0d.*Dsat0d.*i2.*S4.*alphaSat+Asat0a.*Asat0d.^2.*Dsat0d.*i2.
*S4.*alphaSat+i1.*S2.* (Asat0d.^2.* ((-1)+Asat0a).*Dsat0a+(-
1).*Asat0a.*Dsat0d).*alphaSat+(-1).*Asat0a.*Dsat0d.* ((-1)+Dsat0a).*S1+((-
1)+Dsat0d).*S2.*S3+alphaSat)+(-1).*Asat0d.* (Dsat0a.* (2+Asat0a.*((-
2)+Dsat0d)+(-2).*Dsat0d).*S1+Asat0a.*Dsat0d.* (S1+S2.*S3+(-
1).*Dsat0d.*S2.*S3+(-2).*alphaSat)+((-1)+Asat0a).*Dsat0a.*alphaSat))+((-
4).*Asat0a.*Dsat0d.^2.*S2.* (i1.* (S1+(-1).*S2.*S3)+i3.* (S2+(-
1).*S1.*S4)+i2.* ((-1)+S3.*S4)).* (Asat0a.*S2.* (Dsat0d.*S3.*((-
1).*i1.*S2+i2.*S4)+Dsat0a.* ((-1).*i2+i1.*S1+i3.*S2+(-1).*i3.*S1.*S4))+((-
1).*Asat0a+Asat0d).*Dsat0a.* (i1.*S2+(-
1).*i2.*S4).*alphaSat)+ (Asat0a.*Dsat0d.*S2.* ((-1)+(-
1).*Dsat0a).*i2+(1+Dsat0a).*i1.*S1+(-
1).* (1+Dsat0d).*i1.*S2.*S3+(1+Dsat0d).*i2.*S3.*S4+(1+Dsat0a).*i3.* (S2+(-
1).*S1.*S4))+((1+(-1).*Asat0a).*Asat0d.*Dsat0a+Asat0a.*((-

```

```

1)+Asat0d).*Dsat0d).*(i1.*S2+(-1).*i2.*S4).*alphaSat).^2).^^(1/2)+(-
1).*Asat0d.*((-4).*Asat0a.*Dsat0d.^2.*S2.*(i1.*(S1+(-1).*S2.*S3)+i3.*(S2+(-
1).*S1.*S4)+i2.*((-1)+S3.*S4)).*(Asat0a.*S2.*(Dsat0d.*S3.*((-
1).*i1.*S2+i2.*S4)+Dsat0a.*((-1).*i2+i1.*S1+i3.*S2+(-1).*i3.*S1.*S4)))+((-
1).*Asat0a+Asat0d).*Dsat0a.*(i1.*S2+(-
1).*i2.*S4).*alphaSat)+(Asat0a.*Dsat0d.*S2.*((-1)+(-
1).*Dsat0a).*i2+(1+Dsat0a).*i1.*S1+(-
1).*(1+Dsat0d).*i1.*S2.*S3+(1+Dsat0d).*i2.*S3.*S4+(1+Dsat0a).*i3.*(S2+(-
1).*S1.*S4))+((1+(-1).*Asat0a).*Asat0d.*Dsat0a+Asat0a.*((-
1)+Asat0d).*Dsat0d).*(i1.*S2+(-1).*i2.*S4).*alphaSat).^2).^^(1/2));
id=fd.*Dsat0d;
ia=fa.*Asat0a;

```

```

function
[fret,alpha,id,ia]=fretWithSat_2(i1,i2,i3,expRat,S1,S2,S3,S4,tauD,tauA,sigma
aD,sigmaDa,sigmaA,sigmaAd,phiD,phiA)
% This function takes the saturation of donor and acceptor fluorescence
% into consideration, but neglects FRET frustration as a result of acceptor
saturation.
% It calculates both E and alpha when the donor-acceptor ratio is known.
%
% i1,i2,i3 - intensities measured in the donor, FRET and acceptor channel,
respectively
% expRat - the ratio of the number of donors to acceptors
% S1,S2,S3,S4 - overspill parameters
% tauD,tauA - fluorescence lifetime of the donor and acceptor, respectively
% sigmaD,sigmaDa - absorption cross-section of the donor at the donor and
acceptor excitation wavelength, respectively
% sigmaA,sigmaAd - absorption cross-section of the acceptor at the acceptor
and donor excitation wavelength, respectively
% phiD,phiA - photon flux of the donor- and acceptor-exciting laser,
respectively
%
% fret,alpha,id,ia - solutions for the FRET efficiency, alpha, unquenched
donor fluorescence and directly-excited acceptor fluorescence
%
% Dsat0d - fractional saturation of the donor at the donor excitation
wavelength
% Dsat0a - fractional saturation of the donor at the acceptor excitation
wavelength
% Asat0a - fractional saturation of the acceptor at the acceptor excitation
wavelength
% Asat0d - fractional saturation of the acceptor at the donor excitation
wavelength
%
% Peter Nagy, email: peter.v.nagy@gmail.com

Dsat0d=sigmaD.*tauD.*phiD.*(1+sigmaD.*tauD.*phiD).^(-1);
Dsat0a=sigmaDa.*tauD.*phiA.*(1+sigmaDa.*tauD.*phiA).^(-1);
Asat0d=sigmaAd.*tauA.*phiD.*(1+sigmaAd.*tauA.*phiD).^(-1);
Asat0a=sigmaA.*tauA.*phiA.*(1+sigmaA.*tauA.*phiA).^(-1);

fret=(1/2).*Dsat0d.^(-1).*(expRat.*(Asat0a.*Asat0d.*Dsat0d.*S3.*(i1.* ...
S2+(-1).*i2.*S4)+Asat0a.*Dsat0d.*S3.*((-1).*i1.*S2+i2.*S4)+ ...
Asat0a.*Dsat0a.*i3.*(S2+(-1).*S1.*S4)+Asat0d.*Dsat0a.*((-1)+ ...
Asat0a).*i2+i1.*(S1+(-1).*Asat0a.*S1)+Asat0a.*i3.*((-1).*S2+S1.* ...
S4))).*tauA+Asat0a.*Asat0d.*(Dsat0d.*S3.*(i1.*S2+(-1).*i2.*S4)+ ...
Dsat0a.*(i2+(-1).*i1.*S1+(-1).*i3.*S2+i3.*S1.*S4)).*tauD).^(-1).*( ...
Asat0a.*Dsat0d.*expRat.*((-1).*i1.*S2.*S3+i2.*S3.*S4+i3.*(S2+(-1) ...
.*S1.*S4)).*tauA+Asat0d.*expRat.*((-1)+Asat0a).*Dsat0a.*(i2+(-1).* ...
i1.*S1)+Asat0a.*Dsat0d.*((-1).*i3.*S2+i1.*S2.*S3+i3.*S1.*S4+(-1).* ...
i2.*S3.*S4)).*tauA+Asat0a.*Asat0d.*(Dsat0a.*(i2+(-1).*i1.*S1+(-1).* ...
i3.*S2+i3.*S1.*S4)+Dsat0d.*(i2+(-1).*i1.*S1+(-1).*i3.*S2+2.*i1.* ...
S2.*S3+i3.*S1.*S4+(-2).*i2.*S3.*S4)).*tauD+(-1).*((Asat0a.*Dsat0d.* ...
expRat.*((-1).*i1.*S2.*S3+i2.*S3.*S4+i3.*(S2+(-1).*S1.*S4)).*tauA+ ...
Asat0d.*expRat.*((-1)+Asat0a).*Dsat0a.*(i2+(-1).*i1.*S1)+Asat0a.* ...
Dsat0d.*((-1).*i3.*S2+i1.*S2.*S3+i3.*S1.*S4+(-1).*i2.*S3.*S4)).* ...
tauA+Asat0a.*Asat0d.*(Dsat0a.*(i2+(-1).*i1.*S1+(-1).*i3.*S2+i3.*S1.* ...
S4)+Dsat0d.*(i2+(-1).*i1.*S1+(-1).*i3.*S2+2.*i1.*S2.*S3+i3.*S1.* ...
S4+(-2).*i2.*S3.*S4)).*tauD).^2+(-4).*Asat0a.*Asat0d.*Dsat0d.*(i1.*( ...
S1+(-1).*S2.*S3)+i3.*(S2+(-1).*S1.*S4)+i2.*((-1)+S3.*S4)).*tauD.*( ...
Asat0a.*expRat.*(Dsat0d.*S3.*(i1.*S2+(-1).*i2.*S4)+Dsat0a.*i3.*((-1) ...
.*S2+S1.*S4)).*tauA+Asat0d.*(Dsat0a.*expRat.*(i2+(-1).*Asat0a.* ...
i2+((-1)+Asat0a).*i1.*S1+Asat0a.*i3.*(S2+(-1).*S1.*S4)).*tauA+ ...

```



```

Asat0a.*Dsat0a.*((-1).*i2+i1.*S1+i3.*(S2+(-1).*S1.*S4)).*tauD+(-1).* ...
Asat0a.*Dsat0d.*S3.*(i1.*S2+(-1).*i2.*S4).*(expRat.*tauA+tauD))).^( ...
1/2));
fd=(1/2).*Dsat0d.^(-1).* (i1.*S2+(-1).*i2.*S4).*(S2+(-1).*S1.*S4).^( ...
-1).*(Asat0a.*Dsat0d.*expRat.*((1+(-1).*Dsat0d).*S3.*(i1.*S2+(-1) ...
.*i2.*S4)+((-1)+Dsat0a).*i3.*(S2+(-1).*S1.*S4)).*tauA+Asat0d.*( ...
Asat0a.*Dsat0d.*expRat.*((-1)+Dsat0d).*S3.*(i1.*S2+(-1).*i2.*S4)+ ...
i3.*(S2+(-1).*S1.*S4)).*tauA+Dsat0a.*expRat.*((-1)+Asat0a).*((-1)+ ...
Dsat0d).*i2+((-1)+Asat0a+Dsat0d+(-1).*Asat0a.*Dsat0d).*i1.*S1+ ...
Asat0a.*Dsat0d.*i3.*((-1).*S2+S1.*S4)).*tauA+Asat0a.*Dsat0a.*((-1)+ ...
Dsat0d).*(i2+(-1).*i1.*S1+(-1).*i3.*S2+i3.*S1.*S4).*tauD+Asat0a.*(( ...
-1)+Dsat0d).*(i1.*(S1+((-1)+Dsat0d).*S2.*S3)+i3.*(S2+(-1).*S1.*S4) ...
+i2.*((-1)+S3.*(S4+(-1).*Dsat0d.*S4))).*tauD)).^(-1).*(Asat0a.* ...
Dsat0d.*expRat.*((1+(-1).*Dsat0d).*S3.*(i1.*S2+(-1).*i2.*S4)+((-1) ...
+2.*Dsat0a+(-1).*Dsat0d).*i3.*(S2+(-1).*S1.*S4)).*tauA+Asat0d.*( ...
Dsat0a.*expRat.*((-1)+Asat0a).*((-1)+Dsat0d).*i2+((-1)+Asat0a+ ...
Dsat0d+(-1).*Asat0a.*Dsat0d).*i1.*S1+(-2).*Asat0a.*Dsat0d.*i3.*( ...
S2+(-1).*S1.*S4)).*tauA+Asat0a.*Dsat0a.*((-1)+Dsat0d).*(i2+(-1).* ...
i1.*S1+(-1).*i3.*S2+i3.*S1.*S4).*tauD+Asat0a.*Dsat0d.*(expRat.*(( ...
-1)+Dsat0d).*S3.*(i1.*S2+(-1).*i2.*S4)+(1+Dsat0d).*i3.*(S2+(-1).* ...
S1.*S4)).*tauA+((-1)+Dsat0d).*((-1).*i2+i1.*S1+i3.*(S2+(-1).*S1.*S4) ...
).*tauD))+(-1).*((Asat0a.*Dsat0d.*expRat.*((-1).*i1.*S2.*S3+i2.*S3.* ...
S4+i3.*(S2+(-1).*S1.*S4)).*tauA+Asat0d.*expRat.*((-1)+Asat0a).* ...
Dsat0a.*(i2+(-1).*i1.*S1)+Asat0a.*Dsat0d.*((-1).*i3.*S2+i1.*S2.* ...
S3+i3.*S1.*S4+(-1).*i2.*S3.*S4)).*tauA+Asat0a.*Asat0d.*(Dsat0a.*(i2+ ...
(-1).*i1.*S1+(-1).*i3.*S2+i3.*S1.*S4)+Dsat0d.*(i2+(-1).*i1.*S1+( ...
-1).*i3.*S2+2.*i1.*S2.*S3+i3.*S1.*S4+(-2).*i2.*S3.*S4)).*tauD).^2+( ...
-4).*Asat0a.*Asat0d.*Dsat0d.*(i1.*(S1+(-1).*S2.*S3)+i3.*(S2+(-1).* ...
S1.*S4)+i2.*((-1)+S3.*S4)).*tauD.*(Asat0a.*expRat.*(Dsat0d.*S3.*( ...
i1.*S2+(-1).*i2.*S4)+Dsat0a.*i3.*((-1).*S2+S1.*S4)).*tauA+Asat0d.*( ...
Dsat0a.*expRat.*(i2+(-1).*Asat0a.*i2+((-1)+Asat0a).*i1.*S1+ ...
Asat0a.*i3.*(S2+(-1).*S1.*S4)).*tauA+Asat0a.*Dsat0a.*((-1).*i2+i1.* ...
S1+i3.*(S2+(-1).*S1.*S4)).*tauD+(-1).*Asat0a.*Dsat0d.*S3.*(i1.*S2+( ...
-1).*i2.*S4).*(expRat.*tauA+tauD))).^(1/2)+Dsat0d.*(Asat0a.*Dsat0d.*
...
expRat.*((-1).*i1.*S2.*S3+i2.*S3.*S4+i3.*(S2+(-1).*S1.*S4)).*tauA+ ...
Asat0d.*expRat.*((-1)+Asat0a).*Dsat0a.*(i2+(-1).*i1.*S1)+Asat0a.* ...
Dsat0d.*((-1).*i3.*S2+i1.*S2.*S3+i3.*S1.*S4+(-1).*i2.*S3.*S4)).* ...
tauA+Asat0a.*Asat0d.*(Dsat0a.*(i2+(-1).*i1.*S1+(-1).*i3.*S2+i3.*S1.* ...
S4)+Dsat0d.*(i2+(-1).*i1.*S1+(-1).*i3.*S2+2.*i1.*S2.*S3+i3.*S1.* ...
S4+(-2).*i2.*S3.*S4)).*tauD).^2+(-4).*Asat0a.*Asat0d.*Dsat0d.*(i1.*( ...
S1+(-1).*S2.*S3)+i3.*(S2+(-1).*S1.*S4)+i2.*((-1)+S3.*S4)).*tauD.*( ...
Asat0a.*expRat.*(Dsat0d.*S3.*(i1.*S2+(-1).*i2.*S4)+Dsat0a.*i3.*(( ...
-1).*S2+S1.*S4)).*tauA+Asat0d.*(Dsat0a.*expRat.*(i2+(-1).*Asat0a.* ...
i2+((-1)+Asat0a).*i1.*S1+Asat0a.*i3.*(S2+(-1).*S1.*S4)).*tauA+ ...
Asat0a.*Dsat0a.*((-1).*i2+i1.*S1+i3.*(S2+(-1).*S1.*S4)).*tauD+(-1).* ...
Asat0a.*Dsat0d.*S3.*(i1.*S2+(-1).*i2.*S4).*(expRat.*tauA+tauD))).^( ...
1/2));
fa=(1/2).*Asat0a.^(-1).*(S2+(-1).*S1.*S4).^(-1).*(((1+(-1)+Asat0a).* ...
Asat0d.*Dsat0a+Asat0a.*Dsat0d+(-1).*Asat0a.*Asat0d.*Dsat0d).* ...
expRat.*tauA+Asat0a.*Asat0d.*(Dsat0a+(-1).*Dsat0d).*tauD).^(-1).*( ...
Asat0a.*Dsat0d.*expRat.*((-1).*i1.*S2.*S3+i2.*S3.*S4+i3.*(S2+(-1) ...
.*S1.*S4)).*tauA+Asat0d.*expRat.*((-1)+Asat0a).*Dsat0a.*(i2+(-1).* ...
i1.*S1)+Asat0a.*Dsat0d.*((-1).*i3.*S2+i1.*S2.*S3+i3.*S1.*S4+(-1).* ...
i2.*S3.*S4)).*tauA+Asat0a.*Asat0d.*(Dsat0a+(-1).*Dsat0d).*(i2+i3.* ...
S2+(-1).*S1.*(i1+i3.*S4)).*tauD+((Asat0a.*Dsat0d.*expRat.*((-1).* ...
i1.*S2.*S3+i2.*S3.*S4+i3.*(S2+(-1).*S1.*S4)).*tauA+Asat0d.*expRat.*( ...
((-1)+Asat0a).*Dsat0a.*(i2+(-1).*i1.*S1)+Asat0a.*Dsat0d.*((-1).* ...
i3.*S2+i1.*S2.*S3+i3.*S1.*S4+(-1).*i2.*S3.*S4)).*tauA+Asat0a.* ...
Asat0d.*(Dsat0a.*(i2+(-1).*i1.*S1+(-1).*i3.*S2+i3.*S1.*S4)+ ...
Dsat0d.*(i2+(-1).*i1.*S1+(-1).*i3.*S2+2.*i1.*S2.*S3+i3.*S1.*S4+( ...

```

```

-2).*i2.*S3.*S4)).*tauD).^2+(-4).*Asat0a.*Asat0d.*Dsat0d.*(i1.*(S1+( ...
-1).*S2.*S3)+i3.*(S2+(-1).*S1.*S4)+i2.*((-1)+S3.*S4)).*tauD.*( ...
Asat0a.*expRat.*(Dsat0d.*S3.*(i1.*S2+(-1).*i2.*S4)+Dsat0a.*i3.*(( ...
-1).*S2+S1.*S4)).*tauA+Asat0d.*(Dsat0a.*expRat.*(i2+(-1).*Asat0a.* ...
i2+((-1)+Asat0a).*i1.*S1+Asat0a.*i3.*(S2+(-1).*S1.*S4)).*tauA+ ...
Asat0a.*Dsat0a.*((-1).*i2+i1.*S1+i3.*(S2+(-1).*S1.*S4)).*tauD+(-1).* ...
Asat0a.*Dsat0d.*S3.*(i1.*S2+(-1).*i2.*S4).*(expRat.*tauA+tauD))))).^ ...
1/2));

id=fd.*Dsat0d;
ia=fa.*Asat0a;

alpha=ia./id.*S2.*expRat.*Dsat0d./Asat0d.*tauA./tauD;

```

```

function
[solutions,solutionsTable]=fretWithSatFrustr_1(i1num,i2num,i3num,S1num,S2num
,S3num,S4num,alphanum,tauDnum,tauAnum,sigmaDnum,sigmaDanum,sigmaAnum,sigmaA
dnum,phiDnum,phiAnum)
% This function takes the saturation of donor and acceptor fluorescence and
% FRET frustration into consideration.
% Numerical solution for the Na<>Nd case (D-A complex + Afree).
%
% i1num,i2num,i3num - intensities measured in the donor, FRET and acceptor
channel, respectively
% S1num,S2num,S3num,S4num - overspill parameters
% alphanum - parameter alpha calculated CONSIDERING fluorophore saturation
% tauDnum,tauAnum - fluorescence lifetime of the donor and acceptor,
respectively
% sigmaDnum,sigmaDanum - absorption cross-section of the donor at the donor
and acceptor excitation wavelength, respectively
% sigmaAnum,sigmaAdnum - absorption cross-section of the acceptor at the
acceptor and donor excitation wavelength, respectively
% phiDnum,phiAnum - photon flux of the donor- and acceptor-exciting laser,
respectively
%
% solutions - structure variable containing the solutions (FRET efficiency,
unquenched donor (Id) and directly-excited acceptor (Ia) intensity)
% solutionsTable - summary of the solutions in table format
%
% Peter Nagy, email: peter.v.nagy@gmail.com
Dsat0dnum=sigmaDnum.*tauDnum.*phiDnum.*(1+sigmaDnum.*tauDnum.*phiDnum).^(-
1);
Asat0anum=sigmaAnum.*tauAnum.*phiAnum.*(1+sigmaAnum.*tauAnum.*phiAnum).^(-
1);

syms i1 i2 i3 S1 S2 S3 S4 Fd Fa fret tauD tauA phiD phiA sigmaD sigmaDa
sigmaA sigmaAd alphaSat
freteqs=[i1==Fa.*S4.*sigmaA.*tauA.*phiA.*(1+sigmaA.*tauA.*phiA).^(-1)+(-
1).*fret.*Fd.*S2.^(-1) ...
.*S4.*alphaSat.*sigmaD.*tauD.*phiD.*(1+sigmaAd.*tauA.*phiD).^(-
1).* (tauA+tauD+(sigmaAd+sigmaD).*tauA.* ...
tauD.*phiD).*(tauD.*((-1)+((-
1)+fret).*sigmaD.*tauD.*phiD)+tauA.^2.*phiD.*(1+sigmaD.* ...
tauD.*phiD).*((-1).*sigmaAd+(-1).*fret.*sigmaD+((-
1)+fret).*sigmaAd.*(sigmaAd+sigmaD).* ...
tauD.*phiD)+tauA.*((-1)+tauD.*phiD.*((-2)+fret).*(sigmaAd+sigmaD)+((-
1)+fret).*sigmaD.* ...
(2.*sigmaAd+sigmaD).*tauD.*phiD))).^(-1)+Fd.*sigmaD.*tauD.*phiD.*((-
1)+fret).*tauD+ ...
tauA.^2.*phiD.*((-1).*sigmaAd+(-1).*fret.*sigmaD+((-
1)+fret).*sigmaAd.*(sigmaAd+sigmaD).* ...
tauD.*phiD)+((-
1)+fret).*tauA.*(1+(2.*sigmaAd+sigmaD).*tauD.*phiD)).*(tauD.*((-1)+((-
-1)+fret).*sigmaD.*tauD.*phiD)+tauA.^2.*phiD.*(1+sigmaD.*tauD.*phiD).*((-
1).*sigmaAd+(-1) ...
.*fret.*sigmaD+((-
1)+fret).*sigmaAd.*(sigmaAd+sigmaD).*tauD.*phiD)+tauA.*((-1)+tauD.*phiD.* (
...
((-2)+fret).*(sigmaAd+sigmaD)+((-
1)+fret).*sigmaD.*(2.*sigmaAd+sigmaD).*tauD.*phiD))).^( ...
-1);
i2==Fa.*S2.*sigmaA.*tauA.*phiA.*(1+sigmaA.*tauA.*phiA).^(-1)+(-
1).*fret.*Fd.*alphaSat.*sigmaD.* ...
tauD.*phiD.*(1+sigmaAd.*tauA.*phiD).^(-
1).* (tauA+tauD+(sigmaAd+sigmaD).*tauA.*tauD.*phiD).*(tauD.* ...

```

```

((-1)+((-1)+fret).*sigmaD.*tauD.*phiD)+tauA.^2.*phiD.*(1+sigmaD.*tauD.*phiD).*((-1)+fret).*sigmaAd+((-1).*fret.*sigmaD+((-1)+fret).*sigmaAd.*(sigmaAd+sigmaD).*tauD.*phiD)+tauA.*((-1)+fret).*tauD.*phiD.*((-2)+fret).*(sigmaAd+sigmaD)+((-1)+fret).*sigmaD.*(2.*sigmaAd+sigmaD).*tauD.*phiD)).^(-1)+Fd.*S1.*sigmaD.*tauD.*phiD.*((-1)+fret).*tauD+tauA.^2.*phiD.*((-1).*sigmaAd+((-1).*fret.*sigmaD+((-1)+fret).*sigmaAd.*(sigmaAd+sigmaD).*tauD.*phiD)+((-1)+fret).*tauA.*(1+(2.*sigmaAd+sigmaD).*tauD.*phiD)).*(tauD.*((-1)+fret).*sigmaD.*tauD.*phiD)+tauA.^2.*phiD.*(1+sigmaD.*tauD.*phiD).*((-1).*sigmaAd+((-1).*fret.*sigmaD+((-1)+fret).*sigmaAd.*(sigmaAd+sigmaD).*tauD.*phiD)+tauA.*((-1)+tauD.*phiD.*((-2)+fret).*(sigmaAd+sigmaD)+((-1)+fret).*sigmaD.*(2.*sigmaAd+sigmaD).*tauD.*phiD)).^(-1);
i3==Fa.*sigmaA.*tauA.*phiA.*(1+sigmaA.*tauA.*phiA).^(-1)+((-1).*fret.*Fd.*S2.^(-1).*alphaSat.*sigmaA.^(-1).*sigmaAd.*sigmaDa.*tauD.*(tauA+tauD+(sigmaA+sigmaDa).*tauA.*tauD.*phiA).*(tauD.*((-1)+fret).*sigmaDa.*tauD.*phiA)+tauA.^2.*phiA.*(1+sigmaDa.*tauD.*phiA).*((-1).*sigmaA+((-1).*fret.*sigmaDa+((-1)+fret).*sigmaA.*(sigmaA+sigmaDa).*tauD.*phiA)+tauA.*((-1)+tauD.*phiA.*((-2)+fret).*(sigmaA+sigmaDa)+((-1)+fret).*sigmaDa.*(2.*sigmaA+sigmaDa).*tauD.*phiA)).^(-1).*phiD.*(1+sigmaAd.*tauA.*phiD).^(-1)+Fd.*S3.*sigmaD.*tauD.*(1+sigmaDa.*tauD.*phiA).*((-1)+fret).*tauD+tauA.^2.*phiA.*((-1).*sigmaA+((-1).*fret.*sigmaDa+((-1)+fret).*sigmaA.*(sigmaA+sigmaDa).*tauD.*phiA)+((-1)+fret).*tauA.*(1+(2.*sigmaA+sigmaDa).*tauD.*phiA)).*(tauD.*((-1)+fret).*sigmaDa.*tauD.*phiA)+tauA.^2.*phiA.*(1+sigmaDa.*tauD.*phiA).*((-1).*sigmaA+((-1).*fret.*sigmaDa+((-1)+fret).*sigmaA.*(sigmaA+sigmaDa).*tauD.*phiA)+tauA.*((-1)+tauD.*phiA.*((-2)+fret).*(sigmaA+sigmaDa)+((-1)+fret).*sigmaDa.*(2.*sigmaA+sigmaDa).*tauD.*phiA)).^(-1).*phiD.*(1+sigmaD.*tauD.*phiD).^(-1)];

solutions=vpasolve(subs(freteqs,...
[i1 i2 i3 S1 S2 S3 S4 tauD tauA phiD phiA sigmaD sigmaDa sigmaA sigmaAd alphaSat],...
[i1num i2num i3num S1num S2num S3num S4num tauDnum tauAnum phiDnum phiAnum sigmaDnum sigmaDanum sigmaAnum sigmaAdnum alphanum]),[fret Fd Fa]);

fretValues=double(solutions.fret());
FdValues=double(solutions.Fd());
FaValues=double(solutions.Fa());
IdValues=FdValues*Dsat0dnum;
IaValues=FaValues*Asat0anum;
solutionsTable=table(fretValues,IdValues,IaValues);

```

```

function
[solutions,solutionsTable]=fretWithSatFrustr_2(i1num,i2num,i3num,S1num,S2num
,S3num,S4num,tauDnum,tauAnum,sigmaDnum,sigmaDanum,sigmaAnum,sigmaAdnum,phiD
num,phiAnum)
% This function takes the saturation of donor and acceptor fluorescence and
% FRET frustration into consideration.
% Numerical solution for the Na=Nd case (only D-A complex, no free D or A).
%
% i1num,i2num,i3num - intensities measured in the donor, FRET and acceptor
channel, respectively
% S1num,S2num,S3num,S4num - overspill parameters
% tauDnum,tauAnum - fluorescence lifetime of the donor and acceptor,
respectively
% sigmaDnum,sigmaDanum - absorption cross-section of the donor at the donor
and acceptor excitation wavelength, respectively
% sigmaAnum,sigmaAdnum - absorption cross-section of the acceptor at the
acceptor and donor excitation wavelength, respectively
% phiDnum,phiAnum - photon flux of the donor- and acceptor-exciting laser,
respectively
%
% solutions - structure variable containing the solutions (FRET efficiency,
alpha, unquenched donor (Id) and directly-excited acceptor (Ia) intensity)
% solutionsTable - summary of the solutions in table format
%
% Peter Nagy, email: peter.v.nagy@gmail.com
Dsat0dnum=sigmaDnum.*tauDnum.*phiDnum.*(1+sigmaDnum.*tauDnum.*phiDnum).^(-
1);
Dsat0anum=sigmaDanum.*tauDnum.*phiAnum.*(1+sigmaDanum.*tauDnum.*phiAnum).^(-
1);
Asat0dnum=sigmaAdnum.*tauAnum.*phiDnum.*(1+sigmaAdnum.*tauAnum.*phiDnum).^(-
1);
Asat0anum=sigmaAnum.*tauAnum.*phiAnum.*(1+sigmaAnum.*tauAnum.*phiAnum).^(-
1);

syms i1 i2 i3 S1 S2 S3 S4 Fd Fa fret tauD tauA phiD phiA sigmaD sigmaDa
sigmaA sigmaAd Dsat0d Dsat0a Asat0d Asat0a
freteqs=[i1==Fd.*sigmaD.*tauD.*phiD.*(((1)+fret).*tauD+tauA.^2.*phiD.*((-
1).*sigmaAd+(-1).* ...
    fret.*sigmaD+((-1)+fret).*sigmaAd.*(sigmaAd+sigmaD).*tauD.*phiD)+((-
1)+fret).*tauA.*(1+( ...
    2.*sigmaAd+sigmaD).*tauD.*phiD)).*(tauD.*((-1)+((-
1)+fret).*sigmaD.*tauD.*phiD)+tauA.^2.* ...
    phiD.*(1+sigmaD.*tauD.*phiD).*((-1).*sigmaAd+(-1).*fret.*sigmaD+((-
1)+fret).*sigmaAd.*( ...
    sigmaAd+sigmaD).*tauD.*phiD)+tauA.*((-1)+tauD.*phiD.*((-
2)+fret).*(sigmaAd+sigmaD)+((-1)+ ...
    fret).*sigmaD.*(2.*sigmaAd+sigmaD).*tauD.*phiD))).^(-
1)+Asat0a.*Asat0d.^(-1).*Fa.* ...
    S4.*tauA.*phiD.*((-
1)+fret).*sigmaAd.^2.*tauA.*tauD.*phiD.*(1+sigmaD.*tauD.*phiD)+(-1) ...
    .*fret.*sigmaD.*(tauA+tauD+sigmaD.*tauA.*tauD.*phiD)+sigmaAd.*((-1)+((-
1)+fret).*sigmaD.* ...
    tauD.*phiD).*(tauA+tauD+sigmaD.*tauA.*tauD.*phiD)).*(tauD.*((-1)+((-
1)+fret).*sigmaD.*tauD.* ...
    phiD)+tauA.^2.*phiD.*(1+sigmaD.*tauD.*phiD).*((-1).*sigmaAd+(-
1).*fret.*sigmaD+((-1)+ ...
    fret).*sigmaAd.*(sigmaAd+sigmaD).*tauD.*phiD)+tauA.*((-
1)+tauD.*phiD.*((-2)+fret).*( ...
    sigmaAd+sigmaD)+((-
1)+fret).*sigmaD.*(2.*sigmaAd+sigmaD).*tauD.*phiD))).^(-1),...

```

```

i2==Fd.*S1.*sigmaD.*tauD.*phiD.*((-1)+fret).*tauD+tauA.^2.*phiD.*((-
1).*sigmaAd+(-1).* ...
    fret.*sigmaD+((-1)+fret).*sigmaAd.*(sigmaAd+sigmaD).*tauD.*phiD)+((-
1)+fret).*tauA.*(1+( ...
    2.*sigmaAd+sigmaD).*tauD.*phiD)).*(tauD.*((-1)+((-
1)+fret).*sigmaD.*tauD.*phiD)+tauA.^2.* ...
    phiD.*(1+sigmaD.*tauD.*phiD).*((-1).*sigmaAd+(-1).*fret.*sigmaD+((-
1)+fret).*sigmaAd.*( ...
    sigmaAd+sigmaD).*tauD.*phiD)+tauA.*((-1)+tauD.*phiD.*((-
2)+fret).* (sigmaAd+sigmaD)+((-1)+ ...
    fret).*sigmaD.*(2.*sigmaAd+sigmaD).*tauD.*phiD))).^(-
1)+Asat0a.*Asat0d.^(-1).*Fa.* ...
    S2.*tauA.*phiD.*((-
1)+fret).*sigmaAd.^2.*tauA.*tauD.*phiD.*(1+sigmaD.*tauD.*phiD)+(-1) ...
    .*fret.*sigmaD.*(tauA+tauD+sigmaD.*tauA.*tauD.*phiD)+sigmaAd.*((-1)+((-
1)+fret).*sigmaD.* ...
    tauD.*phiD).* (tauA+tauD+sigmaD.*tauA.*tauD.*phiD)).*(tauD.*((-1)+((-
1)+fret).*sigmaD.*tauD.* ...
    phiD)+tauA.^2.*phiD.*(1+sigmaD.*tauD.*phiD).*((-1).*sigmaAd+(-
1).*fret.*sigmaD+((-1)+ ...
    fret).*sigmaAd.*(sigmaAd+sigmaD).*tauD.*phiD)+tauA.*((-
1)+tauD.*phiD.*((-2)+fret)).*( ...
    sigmaAd+sigmaD)+((-
1)+fret).*sigmaD.*(2.*sigmaAd+sigmaD).*tauD.*phiD))).^(-1),...
i3==Dsat0a.^(-1).*Dsat0d.*Fd.*S3.*sigmaDa.*tauD.*phiA.*((-1)+fret).*tauD+
...
    tauA.^2.*phiA.*((-1).*sigmaA+(-1).*fret.*sigmaDa+((-
1)+fret).*sigmaA.*(sigmaA+sigmaDa).* ...
    tauD.*phiA)+((-
1)+fret).*tauA.*(1+(2.*sigmaA+sigmaDa).*tauD.*phiA)).*(tauD.*((-1)+((-
-
1)+fret).*sigmaDa.*tauD.*phiA)+tauA.^2.*phiA.*(1+sigmaDa.*tauD.*phiA).*((-
1).*sigmaA+(-1) ...
    .*fret.*sigmaDa+((-
1)+fret).*sigmaA.*(sigmaA+sigmaDa).*tauD.*phiA)+tauA.*((-1)+tauD.*phiA.*(
...
    ((-2)+fret).* (sigmaA+sigmaDa)+((-
1)+fret).*sigmaDa.*(2.*sigmaA+sigmaDa).*tauD.*phiA))).^( ...
    -1)+Fa.*tauA.*phiA.*((-
1)+fret).*sigmaA.^2.*tauA.*tauD.*phiA.*(1+sigmaDa.*tauD.*phiA)+( ...
    -1).*fret.*sigmaDa.*(tauA+tauD+sigmaDa.*tauA.*tauD.*phiA)+sigmaA.*((-
1)+((-1)+fret).* ...
    sigmaDa.*tauD.*phiA).* (tauA+tauD+sigmaDa.*tauA.*tauD.*phiA)).*(tauD.*((-
1)+((-1)+fret).* ...
    sigmaDa.*tauD.*phiA)+tauA.^2.*phiA.*(1+sigmaDa.*tauD.*phiA).*((-
1).*sigmaA+(-1).*fret.* ...
    sigmaDa+((-1)+fret).*sigmaA.*(sigmaA+sigmaDa).*tauD.*phiA)+tauA.*((-
1)+tauD.*phiA.*((-2)+ ...
    fret).* (sigmaA+sigmaDa)+((-
1)+fret).*sigmaDa.*(2.*sigmaA+sigmaDa).*tauD.*phiA))).^(-1)];

solutions=vpasolve(subs(freteqs,...
    [i1 i2 i3 S1 S2 S3 S4 tauD tauA phiD phiA sigmaD sigmaDa sigmaA sigmaAd
    Dsat0d Dsat0a Asat0d Asat0a],...
    [ilnum i2num i3num S1num S2num S3num S4num tauDnum tauAnum phiDnum
    phiAnum sigmaDnum sigmaDanum sigmaAnum sigmaAdnum Dsat0dnum Dsat0anum
    Asat0dnum Asat0anum]),[fret Fd Fa]);

fretValues=double(solutions.fret());
FdValues=double(solutions.Fd());
FaValues=double(solutions.Fa());

```

```
IdValues=FdValues*Dsat0dnum;  
IaValues=FaValues*Asat0anum;  
alphaValues=IaValues*S2num./IdValues*Dsat0dnum/Asat0dnum*tauAnum/tauDnum;  
solutionsTable=table(fretValues,alphaValues,IdValues,IaValues);
```

15. Függelék



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/186/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szendi-Szatmári Tímea
Neptun kód: IN6E7N
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szendi-Szatmári, T.**, Nagyné Szabó, Á. T., Szöllősi, J., Nagy, P.: Reducing the Detrimental Effects of Saturation Phenomena in FRET Microscopy.
Anal. Chem. 91 (9), 6378-6382, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01504>
IF: 6.35 (2018)
2. Nagyné Szabó, Á. T., **Szendi-Szatmári, T.**, Ujlaky-Nagy, L., Rádi, I., Vereb, G., Szöllősi, J., Nagy, P.: The Effect of Fluorophore Conjugation on Antibody Affinity and the Photophysical Properties of Dyes.
Biophys. J. 114 (3), 688-700, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2017.12.011>
IF: 3.665

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 10,015

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10,015**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2020.06.11.

